

Université de Montréal

Effet de la signalisation de ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle des
récepteurs des estrogènes et sur la prolifération cellulaire

Par

Véronique St-Laurent

Département d'obstétrique-gynécologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en sciences biomédicales

Décembre, 2003

©, Véronique St-Laurent, 2003



W
4
U58
2004
V.056

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de la signalisation de ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle des
récepteurs des estrogènes et sur la prolifération cellulaire

présenté par :

Véronique St-Laurent

11/510486 4056

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michèle Brochu
président-rapporteur

André Tremblay
directeur de recherche

Gerardo Ferbeyre
membre du jury

RÉSUMÉ

Les récepteurs des estrogènes α et β sont des facteurs de transcription hormone-dépendants faisant partie de la grande famille des récepteurs nucléaires hormonaux. Ils contiennent une fonction d'activation 1 (AF-1) qui est régulée par phosphorylation et une AF-2 modulée par la présence de ligand. Certains activateurs de la voie des MAP kinases tels que l'EGF (*epidermal growth factor*) augmentent l'activité de ER α et ER β par phosphorylation de l'AF-1. Les quatre membres de la famille des récepteurs de l'EGF sont ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3 et ErbB4. La surexpression de ErbB2 est associée à une prolifération cellulaire accrue. Les ligands de ErbB3 et ErbB4, tels que l'héréguline, permettent la transactivation de ErbB2. Nous étudions l'effet de la signalisation de ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle de ER β et sur la prolifération cellulaire. Nous démontrons que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'héréguline β 1 ou par l'expression d'un mutant constitutif de ErbB2 diminue l'activité ligand-dépendante de ER α et ER β dans les cellules MCF-7 et 293T. Cependant, la diminution observée de l'activité de ER β , contrairement à celle de ER α , est dépendante de la MAP kinase p38. Cette diminution de l'activité de ER β requiert une région de l'AF-1 qui comprend deux sites de phosphorylation des MAP kinases soient les sérines 106 et 124 connues pour leur fonction dans le recrutement du coactivateur SRC-1. L'inhibition de l'activité de ER β est également relevée dans un contexte où SRC-1 est surexprimé. De plus, l'héréguline β 1 fait diminuer la prolifération cellulaire estrogène-dépendante des cellules MCF-7. Les résultats obtenus suggèrent une modulation de l'activité des ER et de la prolifération cellulaire estrogène-dépendante par la signalisation de ErbB2 et de ErbB3. Ces travaux contribuent ainsi à une meilleure compréhension de l'intégration des divers signaux hormonaux associés à la différenciation-prolifération des tissus gynécologiques.

Mots clés : récepteur des estrogènes α et β , récepteurs ErbB, héréguline, fonction d'activation AF-1, MAP kinase, SRC-1.

ABSTRACT

Estrogen receptors α and β are hormone-dependent transcriptional factors that belong to the nuclear hormone receptor superfamily. These receptors contain two activation functions (AF). The C-terminal AF-2 is modulated in a ligand-dependent manner while the N-terminal AF-1 is known to be regulated by phosphorylation. Inducers of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, such as epidermal growth factor (EGF), increases the transcriptional activity of ER α and ER β by AF-1 phosphorylation. There are four members of the EGF receptor family known as ErbB1/EGFR, ErbB2/HER-2, ErbB3 and ErbB4. ErbB2 overexpression is associated with strong cell proliferation. Ligands of ErbB3 and ErbB4 receptors, such as mesenchymal growth factor heregulin (HRG), were shown to transactivate ErbB2 dimer partner. We initiated studies as to whether ER β transcriptional activity is modulated by ErbB2/ErbB3 signaling. As for ER α , we observed a decrease of the estrogen-dependent transcription of ER β in transfected 293T cells and MCF-7 cells following treatment with HRG β and when a constitutively active ErbB2 mutant is expressed. However, as opposed to ER α , the HRG β 1-induced decrease in ER β activity was found to be dependent on p38 MAP kinase pathway. This diminution of activity of ER β requires a region of the AF-1 domain containing two MAPK phosphorylation sites which are serines 106 and 124 known for their role in the recruitment of the coactivator SRC-1. Furthermore, the HRG β 1 transcriptional inhibition is relieved when SRC-1 is overexpressed. HRG β 1 also decreases the estrogen-dependent proliferation of MCF-7 cells. Taken together, these results support a role for the ErbB2 and ErbB3 signaling in the regulation of ER β transcriptional activity and contribute to a better understanding of the integration of the hormonal signals related to differentiation and proliferation of gynecological tissues.

Keywords : estrogen receptors α and β , ErbB receptors, heregulin, activation function 1, MAP kinase, SRC-1.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements	xvi
I. INTRODUCTION.....	1
A. Les estrogènes.....	1
1. Généralités	1
2. Effets physiologiques des estrogènes.....	3
3. Les récepteurs nucléaires	5
4. Régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires hormonaux.....	7
5. Les isoformes des récepteurs des estrogènes	11
6. Le mécanisme ligand-dépendant de l'activation des récepteurs des estrogènes	13
7. Les antiestrogènes	14
8. La régulation de l'activité des récepteurs des estrogènes par la phosphorylation.....	14
9. Régulation des récepteurs des estrogènes par la phosphorylation des corégulateurs	17
10. Les effets non-génomiques des récepteurs des estrogènes	17
B. Les récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB.....	18
1. Les récepteurs tyrosine kinase	18
2. La sous-famille ErbB et leurs ligands	21
3. Signalisation intracellulaire engendrée par les ErbB	23
4. Rôles physiologiques des récepteurs ErbB et de leurs ligands	25
5. La dérégulation pathologique des ErbB	27
6. Approches thérapeutiques ciblant les récepteurs ErbB.....	31

C.	But et hypothèse de recherche	33
II.	MÉTHODOLOGIE	36
III.	ARTICLE SCIENTIFIQUE	38
A.	Accord des coauteurs	38
B.	The Hormone-Dependent Activity of Estrogen Receptor Beta is Altered by a p38-Dependent ErbB2/ErbB3 Signaling to the AF-1 Domain.....	39
C.	État de publication du manuscrit	99
IV.	DISCUSSION	100
V.	BIBLIOGRAPHIE.....	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des coactivateurs et corépresseurs.....	10
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires	6
Figure 2 : Signalisation intracellulaire des facteurs de croissance sur l'activité des récepteurs des estrogènes.	16
Figure 3 : Voies de signalisation impliquant la PI3-kinase	20
Figure 4 : Représentation graphique du récepteur tyrosine kinase de la famille des ErbB.	22

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTR	Coactivateur membre de la famille p160 (<i>Receptor activator for thyroid and retinoid receptor</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
$\alpha\beta$ ERKO	Souris où les gènes codant pour les récepteurs des estrogènes alpha et beta ont été délétés (<i>Alpha beta estrogen receptor knock out</i>)
α ERKO	Souris où le gène codant pour le récepteur des estrogènes alpha a été délété (<i>Alpha estrogen receptor knock out</i>)
AIB1	Coactivateur membre de la famille p160 (<i>Amplified in breast cancer 1</i>)
AP-1	Facteur de transcription impliqué dans l'activation de la prolifération cellulaire (<i>Activation protein 1</i>)
ATP	Adénosine triphosphate
AF-1	Fonction d'activation 1
AF-2	Fonction d'activation 2
AKT	Protéine kinase impliquée dans la survie cellulaire (Synonyme de PKB)
BAD	Protéine proapoptotique (<i>Bcl-x_L/Bcl-2 associated death promoter</i>)
β ERKO	Souris où le gène codant pour le récepteur des estrogènes beta a été délété (<i>Beta estrogen receptor knock out</i>)
CBP	Protéine liant CREB et impliquée dans la coactivation (<i>CREB-binding protein</i>)
CDK	Kinase cycline-dépendante (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine (<i>Chromatin immunoprecipitation</i>)

c-MYC	Facteur de transcription impliqué dans l'activation de la prolifération cellulaire (<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>)
CREB	Facteur de transcription liant l'élément de réponse de l'AMP (adénosine monophosphate) cyclique (<i>Cyclic AMP Response Element-Binding</i>)
DAX-1	Récepteur nucléaire orphelin (<i>Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene 1</i>)
DBD	Domaine de liaison à l'ADN (<i>DNA-binding domain</i>)
DHEA	Déhydroépiandrostérone
E ₁	Estrone
E ₂	17 β -estradiol
E ₃	Estriol
EGF	Facteur de croissance épidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Récepteur de l'EGF
EGR1	Facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire (<i>Early growth response 1</i>)
ER α	Récepteur des estrogènes alpha (<i>Estrogen receptor alpha</i>)
ER β	Récepteur des estrogènes beta (<i>Estrogen receptor beta</i>)
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
ERK	Signal extracellulaire régulateur de kinase (<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>)
ERR	Récepteur apparenté au récepteur des estrogènes (<i>estrogen-related receptor</i>)

FSH	Gonadotrophine stimulant les follicules ovariens (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
GABP	Facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire (<i>Growth-associated binding protein</i>)
GAP	Protéine activant spécifiquement la GTPase Ras (<i>GTPase activating protein</i>)
GnRH	Gonadolibérine (<i>Gonadotropin releasing hormone</i>)
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G (<i>G-protein coupled receptor</i>)
GRB2	Protéine adaptatrice possédant un domaine SH2 (<i>Growth factor receptor-bound B2</i>)
GRIP1	Protéine interagissant avec le récepteur de glucocorticoïdes impliquée dans la coactivation (<i>Glucocorticoid receptor interacting protein</i>)
GSK-3	Kinase de la glycogène synthase 3 β (<i>Glycogen synthase kinase-3β</i>)
HDAC	Histone désacétylase
HER2	Récepteur de l'héréguline de type 2
HER3	Récepteur de l'héréguline de type 3
HER4	Récepteur de l'héréguline de type 4
HRG	Facteur de croissance héréguline
HSP70	Protéine de choc thermique de 70 kDa (<i>Heat shock protein of 70 kDa</i>)
HSP90	Protéine de choc thermique de 90 kDa (<i>Heat shock protein of 90 kDa</i>)
IGF	Facteur de croissance apparenté à l'insuline (<i>Insulin-like growth factor</i>)

JNK	MAP kinase phosphorylant l'extrémité N-terminale du facteur de transcription c-Jun (<i>C-Jun NH₂-terminal kinase</i>)
LBD	Domaine de liaison au ligand (<i>Ligand-binding domain</i>)
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<i>Low-density lipoprotein</i>)
LH	Gonadotrophine lutéinisante (<i>Luteinizing hormone</i>)
MAP kinase	Protéine kinase activatrice mitogénique (<i>Mitogen activated protein kinase</i>)
MEK1	MAP kinase kinase
MEK6	MAP kinase kinase
MEKK1	MEK kinase
mL	Millilitre (1×10^{-3} litre)
MTA1	Corépresseur des récepteurs nucléaires (<i>Metastasis-associated protein 1</i>)
MTT	Composé utilisé pour exécuter des essais de prolifération cellulaire ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl] tetrazolium bromide)
NCoA1	Coactivateur des récepteurs nucléaires (<i>Nuclear coactivator 1</i>)
NCoR	Corépresseur des récepteurs nucléaires (<i>Nuclear receptor corepressor</i>)
NDF	Facteur de différenciation Neu (<i>Neu differentiation factor</i>)
NRG	Neuréguline
OHT	Antiestrogène partiel (tamoxifène)
P450(11) β	Enzyme impliqué dans la biosynthèse des minéralocorticoïdes et des corticostéroïdes

P450c17	Enzyme 17 α hydroxylase/17,20 lyase impliqué dans la formation des androgènes et des estrogènes
P450scc	Enzyme agissant sur le cholestérol pour former des composés stéroïdiens (<i>P450 side-chain cleavage</i>)
P70S6K	Protéine kinase phosphorylant la protéine S6
P85S6K	Protéine kinase phosphorylant la protéine S6
PAK-1	Kinase activatrice de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p21 (<i>p21-activated kinase-1</i>)
p/CAF	Facteur associé à p300 et CBP et impliqué dans la coactivation (<i>p300- and CBP-associated factor</i>)
p/CIP	Coactivateur membre de la famille p160 (<i>cointegrator-associated protein</i>)
PDK1	Kinase phosphoinositide 3- dépendante de type 1 (<i>3-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
pg	Picogramme (1×10^{-12} gramme)
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3 kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PPAR γ	Récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxisomes (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
pRB	Protéine impliquée dans le cycle cellulaire (<i>Retinoblastoma protein</i>)
PTB	Domaine protéique permettant d'interagir avec un motif contenant des résidus tyrosine phosphorylés (<i>P-tyr binding domain</i>)
RAC	Coactivateur membre de la famille p160 (<i>Receptor-associated coactivator</i>)
REA	Répresseur de l'activité des récepteurs des estrogènes (<i>Repressor of estrogen receptor activity</i>)

RIP 140	Corépresseur des récepteurs nucléaires (<i>Retinoic acid receptor interacting protein</i>)
RLU	Unité de luciférase relative (<i>Relative luciferase unit</i>)
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RXR	Récepteur de rétinoïdes X (<i>Retinoid X receptor</i>)
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes (<i>Selective modulator of estrogen receptor</i>)
SH2	Domaine protéique permettant d'interagir avec un motif contenant des résidus tyrosine phosphorylés (<i>Src-homology domain 2</i>)
SH3	Domaine protéique permettant aux protéines adaptatrices de s'associer (<i>Src-homology domain 3</i>)
SHC	Protéine adaptatrice contenant un domaine SH2 (<i>SH2-containing α_2 collagen-related proteins</i>)
SHP	Récepteur nucléaire orphelin (<i>Short heterodimer partner</i>)
SMRT	Corépresseur des récepteurs nucléaires (<i>Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>)
SOS	Protéine adaptatrice possédant un domaine SH2 (<i>Son of seven less</i>)
SP1	Facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes associés à divers processus cellulaires (<i>Specificity protein 1</i>)
SP3	Facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes associés à divers processus cellulaires (<i>Specificity protein 3</i>)
Src	Protéine tyrosine kinase soluble
SRC-1	Coactivateur de récepteur de stéroïdes 1 (<i>Steroid receptor coactivator 1</i>)

SRC-2	Coactivateur de récepteur de stéroïdes 2 (<i>Steroid receptor coactivator 2</i>)
SRC-3	Coactivateur de récepteur de stéroïdes 3 (<i>Steroid receptor coactivator 3</i>)
STAT5	Protéine de transduction et d'activation de la transcription 5 (<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>)
TAF _{II} 250	Facteur associé à TBP (<i>TBP-associated factor</i>)
TBP	Protéine liant la boîte TATA (<i>TATA box-binding protein</i>)
TGF α	Facteur de croissance (<i>Transforming growth factor alpha</i>)
TIF2	Facteur de transcription intermédiaire impliqué dans la coactivation. Synonyme de SRC-2 (<i>Transcription intermediary factor 2</i>)
TR	Récepteur d'hormones thyroïdiennes (<i>Thyroid hormone receptor</i>)
TRAM-1	Coactivateur membre de la famille p160 (<i>Thyroid hormone receptor activator</i>)
TRAP	Protéine associée au récepteur d'hormones thyroïdiennes impliquée dans la coactivation (<i>Thyroid receptor associated protein</i>)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelium growth factor</i>)

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Conseil de recherche en sciences naturelles et génie pour m'avoir octroyé une bourse me permettant de mener à bien ce projet. Merci aux stagiaires Sich Dung Lao, Alexandra Roy, Caroline Bélanger et Simon Blouin pour leur aide technique. Merci également à mes collègues étudiantes graduées Catherine Charbonneau, Mélanie Sanchez, Julie Lepage ainsi qu'à ma collègue stagiaire post-doctorale Roberta Avallone pour leur soutien technique et moral tout au long de mon projet de maîtrise. Finalement, l'accomplissement de ce projet n'aurait pu être possible sans le soutien, l'encadrement et la disponibilité de mon directeur de recherche, Dr André Tremblay.

I. INTRODUCTION

A. Les estrogènes

1. Généralités

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes qui exercent une panoplie d'actions biologiques sur différents tissus de l'organisme. Les principes généraux de la synthèse des estrogènes, les différentes sources de ces hormones, le transport des estrogènes ainsi que les niveaux de ce type de stéroïdes dans la circulation chez la femme sont décrits dans la présente section.

Les trois types d'estrogènes naturels sont l'estrone (E_1), le 17β -estradiol (E_2) et l'estriol (E_3). Ce sont des molécules dérivées du cholestérol et qui sont composées de 18 atomes de carbone. Par conséquent, comme pour l'ensemble des composés stéroïdiens, la synthèse des estrogènes est dépendante de la quantité de cholestérol disponible ainsi que du transport du cholestérol du cytosol à la membrane interne de la mitochondrie. La membrane mitochondriale possède des enzymes de la famille P450 notamment la P450scc (*P450 side-chain cleavage*) qui a pour fonction de cliver le cholestérol et de contribuer ainsi à la formation de stéroïdes (1) et la P450 (11) β qui agit plutôt au niveau de la biosynthèse des minéralocorticoïdes et des corticostéroïdes (2). Toutefois, l'étape limitante de synthèse des ligands stéroïdiens est catalysée par la P450scc. Le cholestérol est converti en pregnenolone par la P450scc. La pregnenolone subit l'action de la 3β -hydroxy-stéroïde déhydrogénase pour ensuite devenir de la progestérone (3,4). Dans les gonades et dans la zone réticulée de la glande surrénale, une autre enzyme, la P450c17, possède une activité hydroxylase et une activité lyase pouvant servir à former les précurseurs des stéroïdes sexuels (5). En effet, la P450c17 convertit la pregnenolone et la progestérone en androgènes soient en déhydroépiandrostérone (DHEA), en androstènedione et en testostérone (6,7). Trois réactions consécutives d'hydroxylation, effectuées par le complexe P450 aromatasé monooxygénase qui est situé dans le réticulum

endoplasmique, permettent la formation de l'estrone et de l'estradiol à partir de l'androstènedione et de la testostérone respectivement (8). Ainsi, les estrogènes peuvent également être synthétisés à partir de précurseurs androgéniques présents dans la circulation sanguine. La majorité des estrogènes (environ 97%) circulent dans le sérum en étant liée de façon réversible à une protéine. Les protéines liant les estrogènes sont la β -globuline, une protéine liant les hormones sexuelles, ainsi que l'albumine (9). Les 2-3% des estrogènes circulant sous forme libre constituent la forme capable d'interagir avec les récepteurs des estrogènes (8).

Autant chez l'homme que chez la femme, les gonades sont principalement responsables de la synthèse des estrogènes. Les sources prédominantes d'estradiol sont les cellules de la thèque et les cellules granuleuses contenues dans le follicule ovarien ainsi que les cellules lutéinisées qui en dérivent. Une hypothèse selon laquelle les cellules de la thèque secrètent des androgènes qui sont ensuite diffusés aux cellules granuleuses a été proposée (10). Les cellules granuleuses, qui contiennent une P450 aromatasase monooxygénase, complète ainsi la synthèse des estrogènes (10). Quant à l'estrone et l'estriol, ils sont formés majoritairement dans le foie (8). L'activité aromatasase a également été détectée dans les muscles (11), le tissu adipeux (12), les cellules nerveuses (13) et dans les cellules de Leydig des testicules (14). Bien que les estrogènes soient synthétisés chez les deux sexes, les fonctions biologiques de cette catégorie d'hormones sont plutôt associées à l'organisme féminin.

Les niveaux d'estrogènes circulants chez la femme varie selon plusieurs facteurs notamment l'âge et le cycle menstruel. La puberté chez les jeunes filles arrive lorsque les hormones gonadotrophines, qui sont produites par l'adénohypophyse et qui régissent le fonctionnement des gonades, provoquent une hausse des taux d'estradiol dans le sérum. La sécrétion des gonadotrophines est influencée par la présence de peptides hypothalamiques tel que la GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) et les neurotransmetteurs. Ce phénomène par lequel les hormones hypothalamiques et hypophysaires viennent moduler la

production d'hormones stéroïdiennes au niveau de l'ovaire se décrit comme étant l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. La LH (*luteinizing hormone*) et la FSH (*follicle-stimulating hormone*) sont les gonadotrophines qui sont principalement impliquées dans l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Ainsi, chez la jeune fille en puberté, les niveaux d'estradiol peuvent augmenter de 15 pg/mL à 35 pg/ mL suite à l'action des gonadotrophines (15). Après la puberté, durant la période reproductive, la production d'estradiol est à son maximum dans la phase préovulatoire du cycle menstruel et rejoint son plus bas niveau en fin de cycle (8,16). Les gonadotrophines contrôlent la régulation de la production d'estrogènes durant la vie reproductive. Les effets des gonadotrophines peuvent néanmoins être modulés par plusieurs facteurs paracrines tels que l'IGF (*insulin-like growth factor*) (17), les facteurs de croissance provenant de la thèque ou encore les androgènes (8). Durant la ménopause, une perte de follicules ovariens s'amorce entraînant un déclin de la production ovarienne d'estradiol. La majorité de l'estradiol sérique est alors issue de la transformation de la testostérone et ce, dans les sites autres que les gonades. L'estrone devient la forme d'estrogène prédominante chez les femmes ménopausées (8,18).

2. Effets physiologiques des estrogènes

Les effets physiologiques exercés par les estrogènes sont variés. Bien que les estrogènes soient plutôt connus pour cibler plus particulièrement certains tissus et organes tels que les tissus associés aux organes génitaux féminins, la glande mammaire, le système nerveux central, le système vasculaire et les os, ils affectent également d'autres systèmes. Par exemple, certaines études montrent que les estrogènes augmentent l'expression des récepteurs de lipoprotéines dans le foie jouant ainsi un rôle cardioprotecteur en favorisant une baisse des concentrations sériques de cholestérol associés au LDL (*low-density lipoprotein*) (19). De plus, ils auraient une action protectrice contre le cancer du côlon (20).

Les différents tissus composant la glande mammaire et les organes génitaux féminins sont principalement ciblés par les estrogènes. Les lobules des canaux terminaux de la glande mammaire de la jeune femme sont très sensibles aux

estrogènes. En effet, les estrogènes stimulent la croissance et la différenciation de l'épithélium du canal, induisent l'activité mitotique des cellules cylindriques du canal en plus de favoriser la croissance du tissu conjonctif présent dans la glande mammaire (21). La densité des récepteurs des estrogènes dans les tissus composant la glande mammaire est maximale durant la phase folliculaire du cycle menstruel et chute après l'ovulation (22). Les estrogènes favorisent également la prolifération et la différenciation des cellules somatiques présentes dans les follicules ovariens (23). Elles sont par contre considérées mitogènes dans plusieurs formes de cancer du sein et de l'endomètre en favorisant la croissance des cellules cancéreuses (8).

Les estrogènes jouent également un rôle au niveau du système nerveux central. Il y a effectivement une production locale d'estrogènes faite à partir de l'aromatisation d'androgènes au niveau du cerveau (24). Certaines études montrent une action synergique des estrogènes avec les neurotrophines (25). Dans les cellules de neuroblastomes humaines en culture, les estrogènes montrent un effet neuroprotecteur (26) et réduisent la génération de peptides β -amyloïdes (27) pouvant diminuer ainsi les risques de développer la maladie d'Alzheimer.

Il a également été proposé que les estrogènes soient des agents naturellement vasoprotecteurs. Les récepteurs des estrogènes ont été détectés dans les cellules musculaires lisses des artères coronariennes (28) et dans les cellules endothéliales de différents éléments du système vasculaire (29). Certaines études montrent que les estrogènes inhibent l'apoptose, la mort cellulaire programmée, des cellules endothéliales (30) et promouvoient l'activité angiogénique de ces cellules *in vitro* (31).

Il a été montré que les ostéoclastes et les ostéoblastes expriment les récepteurs des estrogènes (32,33). Les estrogènes inhibent la fonction de résorption osseuse des ostéoclastes. De plus, la déficience en estrogènes accélère la perte osseuse et augmente la susceptibilité aux fractures (8). Somme toute, les estrogènes jouent un rôle important au niveau de plusieurs systèmes et fonctions biologiques.

3. Les récepteurs nucléaires

Les estrogènes manifestent leurs effets par l'entremise de récepteurs membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les membres de cette famille de récepteurs non-membranaires sont localisés au niveau du cytoplasme et à l'intérieur du noyau de la cellule. Ce sont des facteurs de transcription qui sont les médiateurs des effets d'un ligand. Par contre, certains récepteurs nucléaires ne sont associés à aucun ligand connu. Cette dernière catégorie de récepteurs est qualifiée d'orphelin. Étant donné que les ligands hormonaux des récepteurs nucléaires sont généralement des stéroïdes, la nature lipophile des ligands leur permet de traverser la membrane plasmique. Ils peuvent ainsi interagir avec leur récepteur nucléaire respectif et manifester leurs effets sur la cellule. Les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les stéroïdes sexuels dont font partie les androgènes, les estrogènes et la progestérone, les hormones thyroïdiennes, l'acide rétinoïque et la vitamine D₃ sont tous des ligands des récepteurs nucléaires (34,35).

Les récepteurs nucléaires contiennent 6 domaines, appelés A, B, C, D, E et F (voir Figure 1). Ces domaines ont été déterminés par homologie de séquence entre les récepteurs nucléaires et ils ne sont pas délimités de façon précise. Il est en effet possible que les limites d'un domaine empiètent sur un autre domaine. Le domaine C est central et correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui est responsable de la liaison du récepteur à une séquence spécifique sur l'ADN (36). Le domaine de liaison au ligand (LBD) est situé dans le domaine E. Les régions A et B situées en N-terminal ainsi que le domaine F localisé en C-terminal sont de longueurs variables selon le type de récepteur. Le domaine D, situé entre les domaines C et E, constitue la région charnière du récepteur (37). Ce domaine varie en longueur également.

les récepteurs des hormones stéroïdiennes, fonctionnent généralement en homodimères et se lient à des séquences palindromiques inversées. Les récepteurs de classe II s'hétérodimérisent avec le partenaire RXR (*retinoid X receptor*) et se lient à des éléments de réponse constitués de séquences répétées directes. Cette classe de récepteurs possèdent également des ligands non-stéroïdiens. Les récepteurs de la classe III et IV sont des récepteurs orphelins. Les membres de la classe III s'homodimérisent et se lient à des séquences répétées directes tandis que ceux de la classe IV comprennent les récepteurs monomériques qui se lient à un site unique d'éléments de réponse (35,37,45). Étant donné la quantité grandissante de récepteurs nucléaires, une nouvelle forme de classification a été proposée par un comité de nomenclature des récepteurs nucléaires composé de Vincent Laudet, Johan Auwerx, Jan-Ake Gustafsson et Walter Wahli en 1999 (46). Cette nouvelle nomenclature est basée sur les séquences génétiques de tous les récepteurs nucléaires plutôt que sur leur fonctionnement et donne lieu à six regroupements au lieu de quatre comme il a été présenté ci-dessus. La nouvelle nomenclature est représentée par un arbre phylogénétique complexe et comprend les récepteurs nucléaires des vertébrés, des arthropodes et des nématodes. Selon cet arbre, le récepteur des estrogènes fait partie ← du même regroupement que ERR (*estrogen-related receptor*), GR (*glucocorticoid receptor*), MR (*mineralocorticoid receptor*), PR (*progesterone receptor*) et AR (*androgen receptor*)

4. Régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires hormonaux

Suite à leur interaction avec l'ADN, les récepteurs nucléaires initient une série d'événements afin d'activer la transcription des gènes cibles. Pour ce faire, il faut d'une part permettre le recrutement de la machinerie de transcription de base ainsi que l'assemblage des coactivateurs mais aussi le remodelage de la chromatine. En effet, si la chromatine est sous sa forme comprimée, la transcription génique est impossible. Deux complexes de facteurs permettant l'ouverture de la chromatine par les récepteurs nucléaires ont été identifiés. Ce sont les complexes ATP-dépendants remodelant les nucléosomes tels que les homologues de SWI/SNF identifiés chez la

levure ainsi que les facteurs comprenant une activité histone acétyltransférase comme p/CAF (*p300- and CBP-associated factor*), CBP (*CREB-binding protein*), p300 et TAF_{II}250 (*TBP-associated factor*). L'acétylation des histones permet d'ouvrir la chromatine et d'activer la transcription. Il semble que ces acétyltransférases ne soient pas directement recrutés aux récepteurs nucléaires mais qu'ils s'associent plutôt avec d'autres coactivateurs montrant une meilleure affinité pour le récepteur lié à son ligand (47). En fait, deux modèles d'assemblage de coactivateurs ont été proposés soient le modèle séquentiel et le modèle combinatoire. De façon générale, la transcription pourrait être considérée comme un processus qui commence par une décompression de la chromatine suivie de l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle afin de permettre l'initiation de la transcription (48). Dans le modèle séquentiel, un complexe protéique contenant des facteurs pouvant remodeler la chromatine (homologue de SWI/SNF) ou possédant une activité acétyltransférase comme par exemple un complexe composé de CBP, p/CAF et de membres de la famille p160, serait recruté en premier. Une fois que l'ouverture de la chromatine est exécutée, le complexe est remplacé par un autre complexe protéique, comme le complexe formé de TRAP (*thyroid receptor associated protein*), DRIP (*vitamin D receptor interacting protein*) et de ARC (*activator-recruited cofactor*), qui possède d'autres fonctions telles que la capacité de recruter des facteurs de transcription de la machinerie transcriptionnelle et d'activer la transcription des gènes. D'autre part, le modèle combinatoire se décrit par l'utilisation combinée de plusieurs complexes de coactivation dont les fonctions se complémentent pour activer la transcription et ce, sur des promoteurs spécifiques (48). Par exemple, les complexes CBP/SRC-1(*steroid receptor coactivator 1*)/p/CAF et TRAP/DRIP/ARC fonctionneraient de façon synergique sur certains promoteurs.

Parmi les coactivateurs interagissant avec les récepteurs nucléaires, la famille de coactivateurs p160 a été largement étudiée. Les membres de cette famille sont SRC-1/NCoA1 (*nuclear coactivator 1*), SRC-2/TIF2 (*transcription intermediary factor 2*)/GRIP1 (*glucocorticoid receptor interacting protein*) et SRC-3/p/CIP (*cointegrator-associated protein*)/AIB1 (*amplified in breast cancer 1*)/ACTR

(*activator for thyroid and retinoid receptor*)/RAC (*receptor-associated coactivator*)/TRAM-1 (*thyroid hormone receptor activator*). SRC-1 et SRC-2 ont été identifiés grâce à leur interaction avec les récepteurs nucléaires en présence de ligand (35) tandis que SRC-3 a été découvert suite à la recherche de gènes qui sont surexprimés dans le cancer du sein (49). Il a été montré que les membres de cette famille agissent généralement de façon ligand-dépendante (35). Bien que SRC-1 et SRC-3 possèdent une activité acétyltransférase (35), ils fonctionnent avec d'autres coactivateurs possédant une activité acétyltransférase, comme ceux mentionnés dans le paragraphe précédent, de sorte à réorganiser la chromatine, modifier et recruter à la fois des facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase II (50).

La région des coactivateurs de la famille SRC qui interagit avec les récepteurs nucléaires possèdent 3 ou 4 motifs LXXLL, où L représente un résidu leucine et X correspond à n'importe quel acide aminé (51). Il a été démontré que ce motif est nécessaire et suffisant pour l'interaction ligand-dépendante avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires (51,52). Des études structurales réalisées sur les domaines de liaison des récepteurs nucléaires PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*), ER (*estrogen receptor*) et TR (*thyroid receptor*) complexés à des fragments de coactivateurs p160 montrent que les motifs LXXLL forment de courtes hélices α . L'hélice LXXLL est placée de telle sorte que les résidus leucines internes forment une poche hydrophobe où le ligand peut venir se lier (52-54).

En plus de leur fonction d'activation de la transcription des gènes, les récepteurs nucléaires peuvent également exercer un rôle physiologique important en réprimant la transcription de certains gènes. Des recherches ont montré que certaines protéines interagissant avec les récepteurs nucléaires sont responsables de cet effet de répression (55,56). En effet, ces protéines appelées corépresseurs peuvent recruter des histones désacétylases (HDAC) qui agissent de façon opposée aux histones acétylases soit en réprimant la transcription (57). Plusieurs corépresseurs des récepteurs nucléaires ont été identifiés jusqu'à présent. Parmi ceux qui peuvent interagir avec

les récepteurs des estrogènes, il y a NCoR (*nuclear receptor corepressor*) et SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) qui sont recrutés par ER α en présence de l'anti-estrogène tamoxifène (58), le cofacteur RIP 140 (*retinoic acid receptor interacting protein*) (59) ainsi que MTA1 (*metastasis-associated protein 1*) (60). D'autres facteurs permettant la répression du récepteur des estrogènes ont été identifiés dont le mode d'action est d'entrer en compétition avec les coactivateurs pour la liaison avec le récepteur. Le facteur REA (*repressor of estrogen receptor activity*) (61) ainsi que les récepteurs orphelins SHP (*short heterodimer partner*) (62) et DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene 1*) (63) utilisent ce type de mécanisme pour inhiber l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes. Une liste des coactivateurs et les corépresseurs des récepteurs nucléaires est présentée dans le tableau suivant (Tableau 1).

Coactivateurs	Corépresseurs
ARC	DAX-1
CBP	MTA1
DRIP	NCoR
p300	REA
p/CAF	RIP 140
SRC-1/NCoA1	SHP
SRC-2/TIF2/GRIP1	SMRT
SRC-3/p/CIP/AIB1/ACTR/RAC/TRAM-1	
TRAP	

Tableau 1 : Liste des coactivateurs et corépresseurs

5. Les isoformes des récepteurs des estrogènes

Pendant longtemps, la littérature indiquait que la signalisation des estrogènes passait par un seul récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce récepteur a été cloné et caractérisé en 1986 par l'équipe de Pierre Chambon (64). Plus récemment, la recherche de nouveaux membres de la superfamille de récepteurs nucléaires a entraîné la découverte d'un deuxième récepteur des estrogènes qui a été identifié comme étant le récepteur des estrogènes β (ER β) (65,66). Ainsi, le premier récepteur découvert est devenu le récepteur des estrogènes α (ER α). Les deux récepteurs sont encodés à partir de gènes distincts situés sur des chromosomes différents soient le chromosome 6 pour le gène de ER α et le chromosome 14 pour le gène de ER β (67). Certains domaines fonctionnels des deux isoformes partagent un niveau d'homologie élevé tels que le domaine de liaison à l'ADN (97% d'homologie) et le domaine de liaison au ligand (60%). Les domaines A et B situés dans la portion N-terminale divergent considérablement d'une isoforme à l'autre avec environ 18% d'homologie (voir Figure 1). ER α et ER β interagissent avec les mêmes éléments de réponse et montrent une affinité similaire pour la liaison de plusieurs estrogènes d'origine naturelle et synthétique *in vitro* (68-70).

Bien que ER α et ER β soient colocalisés dans certains tissus (71), des études montrent un patron d'expression différent pour chaque isoforme de récepteur des estrogènes dans divers tissus. Ces observations suggèrent qu'il n'y aurait pas de redondance au niveau de ces récepteurs dans la signalisation des estrogènes. ER α est l'isoforme prédominant dans la glande mammaire, l'utérus, le col de l'utérus, le vagin. Quant à ER β , il serait exprimé de façon plus importante dans l'ovaire, la prostate, les testicules, la rate, les poumons, l'hypothalamus, le thymus (72) mais aussi dans le système cardiovasculaire, le système immunitaire et le tractus gastrointestinal (67,71,73-75). De plus, les deux récepteurs sont exprimés de façon distincte à différents endroits dans le cerveau (76). Par ailleurs, l'utilisation d'agents thérapeutiques qui ciblent les récepteurs des estrogènes montrent des réponses différentes selon le tissu. Par exemple, une catégorie d'antiestrogènes appelée

modulateurs sélectifs de récepteurs des estrogènes (SERM) et qui comprend le tamoxifène, provoque des effets estrogéniques dans certains tissus et antiestrogéniques dans d'autres (voir section A.7 sur les antiestrogènes pour de plus amples détails concernant le tamoxifène) (77). En fait, les différences tissu-spécifiques aux composés estrogéniques ne dépendent pas uniquement de l'expression prédominante de l'un ou l'autre des isoformes de ER mais aussi de l'expression de corégulateurs dans les tissus. Par exemple, l'existence de plusieurs isoformes des coactivateurs de la famille p160 peut diversifier les réponses aux estrogènes (78).

Une meilleure compréhension des fonctions biologiques des deux isoformes a été possible suite aux observations des souris *knockout* α ERKO et β ERKO où le gène codant pour ER α et ER β a été respectivement délété. Parmi les phénotypes observés, la souris femelle α ERKO possède un tractus reproductif insensible aux estrogènes, montre un hypergonadisme hypergonadotrophique (état où les glandes génitales ont une sécrétion d'hormones sexuelles interne insuffisante), est déficiente au niveau du développement de la glande mammaire à la puberté et accumule le tissu adipeux (79). Il a été observé chez la souris mâle α ERKO une dégénération testiculaire ainsi qu'une dysfonction de l'épididyme (79). Une étude suggère que le rôle protecteur des estrogènes contre les lésions vasculaires serait joué par ER β car cette protection demeure en absence de ER α chez les souris α ERKO (80). Les souris mâles β ERKO, quant à elles, sont fertiles et ne montrent aucun phénotype anormal de façon évidente. Une fonction ovarienne déficiente et une fertilité moindre (moins de portées et moins de rejetons par portée) a été observée chez la souris femelle β ERKO (79). Les souris double *knockout* $\alpha\beta$ ERKO montrent un phénotype qui ressemble considérablement à celui de la souris α ERKO à l'exception du phénotype ovarien. En effet, chez la souris $\alpha\beta$ ERKO, il y a perte progressive des cellules germinales et une redifférenciation des cellules somatiques environnantes. Ces observations suggèrent que les deux isoformes de ER sont requis pour le bon fonctionnement du tissu ovarien (81-83).

Une étude a montré que l'hétérodimère ER α /ER β est favorisé par rapport aux homodimères lorsque les deux partenaires sont co-exprimés (84). Par conséquent, les cellules qui possèdent les deux types de récepteurs peuvent élargir leur répertoire d'activité ER-dépendante en combinant les propriétés transcriptionnelles de chacun des partenaires. Malgré le fait que les deux récepteurs possèdent plusieurs similarités, certaines différences dans le fonctionnement moléculaire des deux types de récepteurs ont été rapportées. Il a été suggéré que ER β inhibe l'activité transcriptionnelle de ER α au lieu d'agir de façon concertée (70). Les deux types de récepteurs montrent des réponses transcriptionnelles opposées lorsqu'ils interagissent avec les facteurs de transcription Fos et Jun sur un élément de réponse de type AP1 (*activation protein 1*) (85). Il y a également des différences au niveau du recrutement de coactivateurs lorsque l'un ou l'autre des récepteurs est lié à un ligand (86). En conclusion, la diversité des réponses aux estrogènes dépend d'une multitude de facteurs.

6. Le mécanisme ligand-dépendant de l'activation des récepteurs des estrogènes

Les estrogènes, en se liant à leur récepteur, activent la transcription des gènes cibles. Les étapes de l'activation transcriptionnelle ligand-dépendante sont sensiblement les mêmes pour ER α et ER β . En absence d'estrogènes, le récepteur est maintenu dans un état inactif au sein d'un complexe protéique comprenant une Hsp90 (*heat shock protein* de 90 kDa) et une Hsp70 (*heat shock protein* de 70 kDa) (87) et ce, à l'intérieur du noyau cellulaire principalement. La liaison du ligand se fait au niveau du domaine de liaison au ligand et induit un changement conformationnel de sorte que le récepteur puisse se dissocier du complexe protéique qui le séquestre, se dimériser et reconnaître un élément de réponse aux estrogènes (ERE) sur l'ADN. L'AF-2 qui est situé dans le domaine de liaison au ligand comprend l'hélice 12 (53,88,89). La liaison du ligand va permettre à l'hélice 12 d'adopter une conformation nécessaire au recrutement de coactivateurs (82) et ainsi permettre le recrutement des facteurs généraux de transcription et l'ARN polymérase II et activer

la transcription des gènes cibles (35). En présence de ligand, les récepteurs des estrogènes peuvent interagir avec différents facteurs de transcription pour induire la transcription à partir de séquence spécifiques sur l'ADN autres que ERE. En effet, il a été montré que les ER dimérisés peuvent interagir avec les facteurs de transcription Fos et Jun et induire la transcription de gènes en se liant à l'élément de réponse AP1 (85). Une récente étude montre qu'en présence d'estrogènes, ER α interagit avec les protéines et facteurs de transcriptions Sp1 et Sp3. Ce complexe initie la transcription en se liant à des motifs riches en guanine et en cytosine sur les promoteurs de certains gènes dont celui du facteur de croissance VEGF (*vasscular endothelial growth factor*) (90).

7. Les antiestrogènes

Les antiestrogènes inhibent le fonctionnement des récepteurs des estrogènes. Ils sont utilisés fréquemment comme traitement hormonal des tumeurs mammaires (91). L'antiestrogène tamoxifène (OHT) n'inhibe que l'AF-2 des récepteurs tandis que les antiestrogènes purs tels que le ICI 164,384 et EM-800, inhibent l'AF-1 et l'AF-2 (92,93). Le tamoxifène est considéré comme un antiestrogène mixte car il possède non seulement une activité antagoniste mais aussi une activité agoniste de ER α dans certains tissus dont l'utérus. Ces effets indésirables limitent le potentiel thérapeutique du tamoxifène. Quant aux antiestrogènes purs, ils ont une activité agoniste négligeable. En fait, le tamoxifène, en se liant au récepteur, permet une conformation intermédiaire de l'hélice 12 qui a pour conséquence de moduler les interactions avec les coactivateurs et les corépresseurs et la transcription de gènes de façon tissu-spécifique (58,94,94). L'activité agoniste du tamoxifène n'a pas été observé avec ER β (68).

8. La régulation de l'activité des récepteurs des estrogènes par la phosphorylation.

L'activité transcriptionnelle de ER peut être également modulée par la signalisation de cascades de protéines kinases cellulaires. En effet, ces cascades sont enclenchées en réponse à certains facteurs de croissance, à des agents activant la PKA

(protéine kinase A) (95-97), à des neurotransmetteurs (98) et à des cyclines (99,100). Étant donné que les cascades de signalisation sont principalement réalisées par des kinases cellulaires, les signaux qui modulent l'activité des récepteurs sont associés à la phosphorylation protéique. Ainsi, la phosphorylation des récepteurs et/ou des protéines qui s'associent aux récepteurs est susceptible d'influencer l'activité transcriptionnelle de ER (43).

Plusieurs études ont montré que la phosphorylation directe de résidus situés dans l'AF-1 (région A/B) des récepteurs des estrogènes suite à l'activation de la voie des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) permet d'activer la transcription ER-dépendante en absence de ligand (voir section B.1 sur les récepteurs tyrosine kinase pour la description des voies de signalisation dont celle des MAP kinases). Étant donné que la séquence des nucléotides comprise dans le domaine AF-1 des deux isoformes des récepteurs varie considérablement, ceux-ci peuvent agir différemment en réponse à l'activation de la voie des MAP kinases. En effet, la phosphorylation de la sérine 118 de ER α par les MAP kinases Erk1/2 est responsable de l'activation de ER α par les facteurs de croissance comme EGF (*epidermal growth factor*) (95,101). L'AF-1 de ER α phosphorylé par les MAP kinases permet aussi le recrutement de protéines de la famille p68/72 qui agissent en tant que coactivateurs (102).

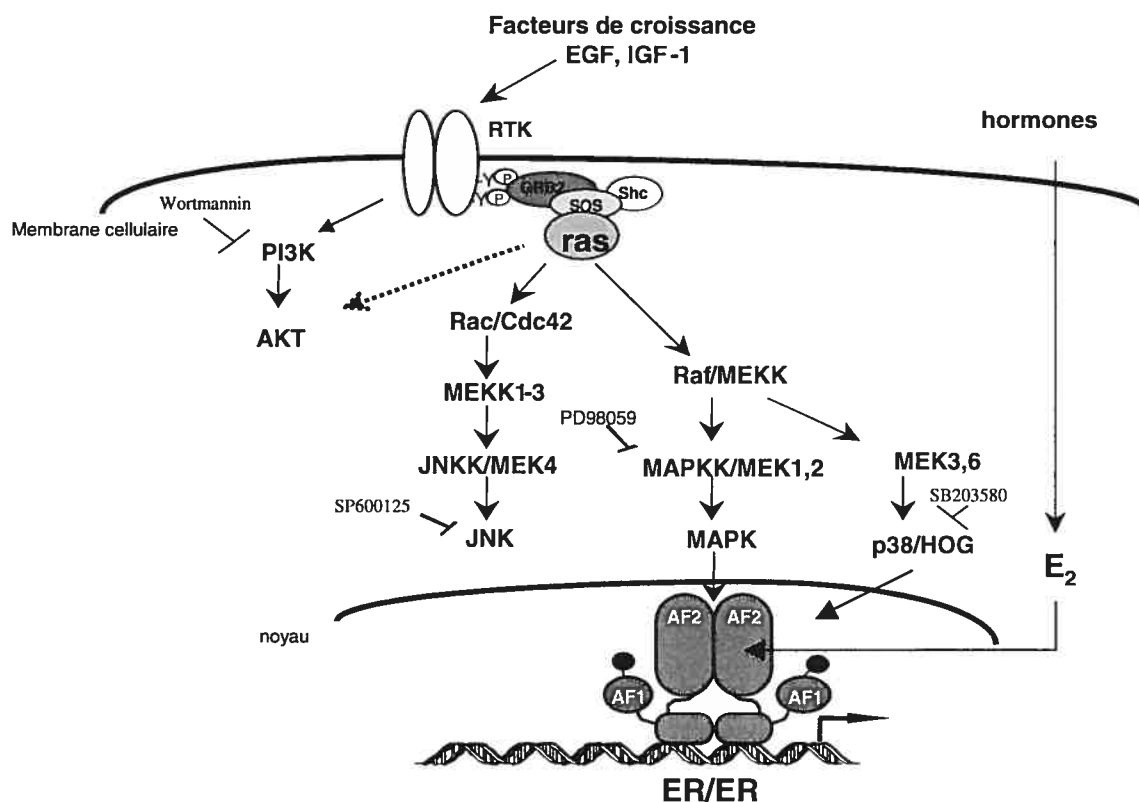


Figure 2 : Signalisation intracellulaire des facteurs de croissance sur l'activité des récepteurs des estrogènes.

Pour ER β , la phosphorylation des sérines 106 et 124 par ces MAP kinases permet le recrutement des coactivateurs SRC-1 et CBP en absence de ligand (103,104). La figure 2 illustre la signalisation des MAP kinases induite par les facteurs de croissance sur l'activité des ER.

Il existe par ailleurs d'autres sites phosphorylables sur les deux formes de récepteurs des estrogènes suite à l'activation de diverses voies de signalisation suggérant que différents stimuli peuvent moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs. En effet, la kinase pp90rsk1 régule l'activité transcriptionnelle de ER α par la phosphorylation de la sérine 167 (105). Les sérines 118 et 305 de ER α sont phosphorylables respectivement par la kinase cycline-dépendante Cdk7 en présence de 17 β -estradiol et par PAK 1 (*p21-activated kinase-1*) (106). La protéine kinase A

phosphoryle la sérine 236 à l'intérieur du domaine de liaison à l'ADN de ER α et cette phosphorylation influence la capacité de dimérisation du récepteur (107). ER α fait également partie des cibles d'Akt et son activité transcriptionnelle est augmentée lorsque la sérine 167 est phosphorylée par Akt (108). La thréonine 311, située dans l'hélice 1 du domaine de liaison au ligand de ER α , est phosphorylable par la MAP kinase p38 et cette modification permet l'activation du récepteur. La liaison de l'estrogène au récepteur n'est pas affectée lorsque la thréonine 311 est mutée mais cela empêche le recrutement de coactivateurs. De plus, l'inhibition de l'activité de p38 empêche la localisation nucléaire du récepteur et ce, même en présence d'estrogènes (109). Une étude suggère que l'activité transcriptionnelle de ER β est elle aussi augmentée par la MAP kinase p38 activée (110). Toutes ces observations montrent qu'il est possible de moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes autrement que par la liaison au ligand. Il est toutefois important de noter que les voies ligand-dépendante et ligand-indépendante ne sont pas mutuellement exclusives.

9. Régulation des récepteurs des estrogènes par la phosphorylation des corégulateurs

La phosphorylation des corégulateurs qui interagissent avec les récepteurs des estrogènes joue également un rôle dans l'activité transcriptionnelle des ER. Par exemple, la voie des MAP kinases permet de phosphoryler le coactivateur SRC-3/AIB1 favorisant ainsi le recrutement de p300 au récepteur des estrogènes et accentue son activité transcriptionnelle (111). Le coactivateur SRC-1 est aussi une cible de la phosphorylation par les MAP kinases et il a été suggéré que cela augmentait par conséquent son activité transcriptionnelle (112).

10. Les effets non-génomiques des récepteurs des estrogènes

La réponse très rapide aux estrogènes de plusieurs types cellulaires suggèrent que les récepteurs de ces hormones possèdent également des actions non-génomiques. Ainsi, les fonctions des récepteurs des estrogènes ne sont pas restreintes uniquement au noyau. Effectivement, certaines interactions directes entre les

récepteurs des estrogènes et des composantes cytoplasmiques des voies de signalisation ont été rapportées. Il a été démontré que ER α lié à son ligand s'associe à la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase (phosphatidylinositol 3 kinase), permettant ainsi l'activation d'Akt et d'une autre enzyme soit la synthase d'oxide nitrique endothéliale (113). L'interaction du récepteur des estrogènes β et du récepteur des androgènes, liés à leur ligand respectif, avec la protéine tyrosine kinase Src permet de former un complexe qui promouvoit la prolifération cellulaire dans les cellules cancéreuses de prostate (114). De plus, les récepteurs des androgènes et des estrogènes associés au complexe Src/Shc (*SH2-containing α_2 collagen-related proteins*)/Erk (*extracellular signal-regulated protein kinase*) provoquent des effets antiapoptotiques (115).

B. Les récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB

1. Les récepteurs tyrosine kinase

La réponse aux facteurs de croissance permet de moduler et de réguler une variété de processus cellulaires incluant la division, l'adhésion entre cellules, la différenciation, la migration et l'apoptose. Les voies de signalisation intracellulaires responsables de ces différents effets sont déclenchées suite à l'activation par les hormones polypeptidiques qui se lient à leur récepteur à la surface cellulaire. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement adéquat de multiples types cellulaires. D'autre part, leur dérégulation est souvent associée à la progression incontrôlée des cellules cancéreuses (116,117).

Près de 20 sous-familles de RTK ont été identifiées dont la sous-famille ErbB. Tous les récepteurs de la famille RTK possèdent un région homologue correspondant à un domaine catalytique tyrosine kinase (118). Les RTK ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire qui sépare la portion tyrosine kinase intracellulaire de la région extracellulaire associée à la liaison du ligand (119). La portion extracellulaire se caractérise par des domaines apparentés à l'immunoglobuline ou à l'EGF, par des

répétitions de fibronectines de type III ainsi que par une ou plusieurs région(s) riche(s) en cystéine. Le nombre de ces domaines varie selon la famille de RTK (117). Le domaine catalytique contient un site liant l'ATP et est capable de catalyser l'autophosphorylation du récepteur ainsi que la phosphorylation des substrats de RTK (120).

Ainsi, les RTK possèdent un domaine cytoplasmique ayant une activité catalytique intrinsèque qui est activée lors de la liaison du facteur de croissance à son récepteur. Cette liaison est suivie d'une dimérisation des récepteurs qui permet la transphosphorylation mutuelle et l'activation des domaines catalytiques. Il en résulte l'autophosphorylation de résidus tyrosine au niveau de la portion intracellulaire des RTK. Les protéines intracellulaires qui possèdent soit un domaine appelé SH2 (*Src-homology domain 2*) ou encore un domaine PTB (*P-tyr binding domain*) reconnaissent spécifiquement les tyrosines phosphorylées du RTK activé. Les protéines qui possèdent des domaines SH2/PTB et qui interagissent avec le récepteur via ces domaines peuvent être soit effectrices ou adaptatrices. La PI3-kinase possède un domaine SH2 ainsi qu'une activité enzymatique et se décrit ainsi comme étant une protéine effectrice. Une fois liée au RTK, la PI3-kinase est phosphorylée et transloquée à la membrane cellulaire où se trouve son substrat, le phospholipide PIP₂. Ensuite, la PI3-kinase activée génère des phospholipides PIP₃ à partir de PIP₂, qui sont éventuellement liés par les kinases intracellulaires PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*) et Akt. Ces kinases sont ensuite transloquées à la membrane cellulaire et PDK1 peut de cette façon activer Akt. Une fois activée, Akt cible une foule de protéines dans le but de promouvoir la survie cellulaire (121,122). Ces protéines cibles d'Akt, dont font partie BAD (*Bcl-x_L/Bcl-2 associated death promoter*), GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3 β*) et les facteurs de transcription de la famille forkhead, sont considérées comme étant proapoptotiques et leurs fonctions sont inhibées une fois qu'elles sont phosphorylées par Akt (123) (voir Figure 3 pour une représentation graphique de la voie de signalisation de PI3-kinase).

Les protéines liant les récepteurs de facteurs de croissance par l'entremise de leur domaine SH2 ou PTB ne sont pas qu'effectrices mais peuvent aussi être adaptatrices comme c'est le cas de Shc, Grb2 (*growth factor receptor-bound B2*) et SoS (*Son of seven less*). Grb2 est capable de lier la portion intracellulaire du récepteur et par la même occasion amener d'autres protéines effectrices à la membrane plasmique lorsque le récepteur tyrosine kinase est activé. Grb2 est associée à la protéine SoS par un domaine appelé SH3 (*Src-homology domain 3*). SoS est un facteur d'échange de GTP pour une protéine appelée Ras. Ainsi, en présence d'un récepteur de facteur de croissance activé, le complexe Grb2/SoS est recruté par le RTK via le domaine SH2 de Grb2. SoS catalyse ensuite l'échange de GDP pour un GTP sur la protéine Ras qui se retrouve ainsi activée. Ras activée interagit avec une série de protéines effectrices dont font partie la protéine sérine

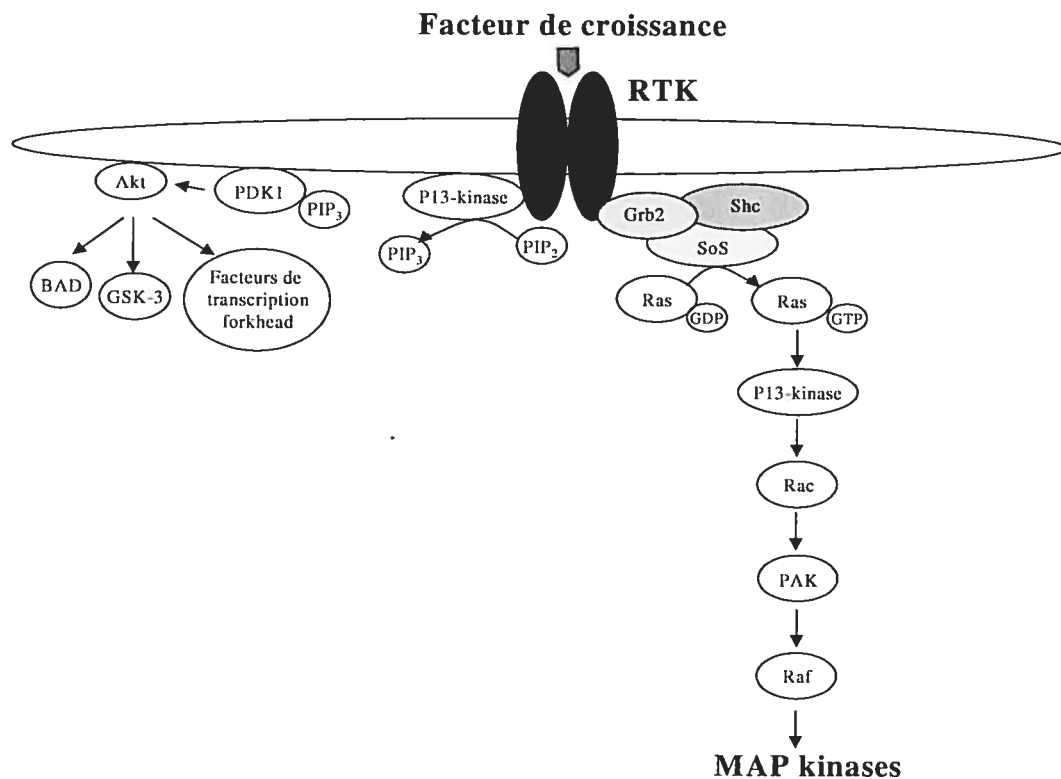


Figure 3 : Voies de signalisation impliquant la PI3-kinase

kinase Raf et aussi la PI3-kinase. Raf permet l'activation de la voie des MAP kinases par une série de cascades de phosphorylation. Les MAP kinases se divisent en 3 groupes soient Erk 1/2 (p42/p44), JNK1, 2 et 3 (*c-Jun NH₂-terminal kinase*) ainsi que p38 (121) (voir Figure 2 pour visualiser les voies de signalisation des MAP kinases). Les MAP kinases activées sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription et permettent ainsi l'activation de la transcription de gènes (123). Par exemple, la translocation des membres Erk dans le noyau permet l'activation de la transcription du gène de la cycline D1 important dans la progression du cycle cellulaire (124), ainsi que des protooncogènes *c-fos* et *c-myc* (125,126). Suite à ces événements, il en résulte une division cellulaire accrue.

2. La sous-famille ErbB et leurs ligands

Les membres de la sous-famille ErbB (ou EGFR pour récepteur à l'EGF) possèdent deux domaines riches en cystéines dans leur portion extracellulaire et détiennent également une région intracellulaire (voir Figure 4). Les quatre membres de la famille ErbB sont : EGFR/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3 et HER4/ErbB4 élargissant ainsi les possibilités d'activation et de signalisation selon le dimère formé (117,127,127). En effet, tous les récepteurs ErbB ont la capacité de s'homodimériser et de s'hétérodimériser. Certains membres de la famille ont des propriétés particulières comme ErbB2 qui ne possède pas de ligand connu (128) et ErbB3 qui ne détient pas d'activité kinase intrinsèque (129). L'absence d'activité kinase oblige ErbB3 à se dimériser avec un autre membre de la famille pour pouvoir déclencher une cascade de signalisation intracellulaire. Une récente étude rapporte que la structure de la région extracellulaire de ErbB2 adopte une conformation similaire à celle d'un récepteur activé par un ligand ce qui supporte une activité ligand-indépendante pour ErbB2 (130). Malgré le fait que toutes les combinaisons dimériques entre les ErbB soient possibles, il a été rapporté que ErbB2 est le partenaire de dimérisation préférentiel des autres récepteurs (131). En effet, ErbB2 agit en tant que corécepteur qui augmente l'affinité du ligand pour le partenaire de dimérisation (132,133).

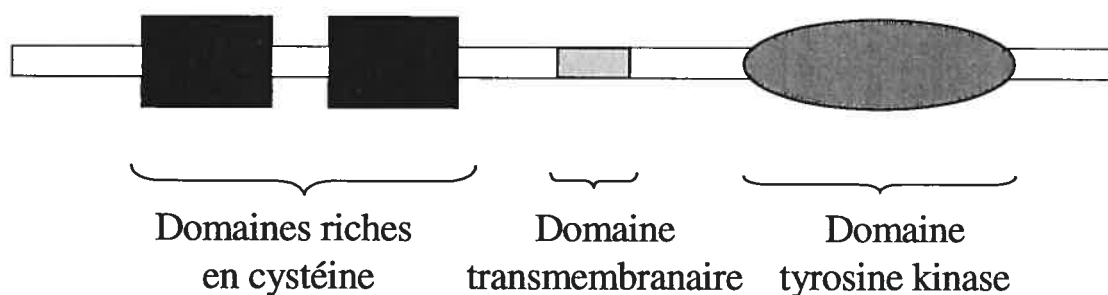


Figure 4 : Représentation graphique du récepteur tyrosine kinase de la famille des ErbB.

Les ErbB sont exprimés majoritairement dans les cellules d'origine mésodermale et ectodermale (116). Dans l'épithélium, les récepteurs ErbB sont localisés au niveau basolatéral ce qui leur permet de jouer un rôle médiateur des signaux entre le mésenchyme et l'épithélium (134). Le mésenchyme, constitué de tissu conjonctif immature où les cellules sont incorporées dans de la matrice extracellulaire, forme une source de nombreux ligands des ErbB (116).

Il existe une grande variété de ligands des ErbB. Ceux qui détiennent une affinité élevée pour les récepteurs, comme l'EGF et l'héréguline $\beta 1$ (HRG $\beta 1$) par exemple, possèdent des domaines apparentés à l'EGF et 3 boucles contenant des ponts disulfures. La portion du ligand interagissant avec le récepteur origine d'un précurseur transmembranaire dont l'expression et le clivage sont hautement régulés (116). Le clivage du ligand à partir du précurseur se fait à l'aide d'une métalloprotéase dont l'activité est stimulée suite à l'activation d'une autre catégorie de récepteurs transmembranaires, les récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) (135). Ainsi, l'activité des ErbB peut être modulée par les récepteurs membranaires GPCR. Il a été proposé que les ligands des ErbB ont une nature bivalente. Ils contiennent deux régions séparées dont une détient une grande affinité et une spécificité étroite et est responsable de la liaison d'un premier récepteur ErbB alors que la deuxième portion du ligand possède une affinité moindre et une spécificité plus large pour la liaison avec le partenaire de dimérisation (136).

Une famille importante de ligands de ErbB comprend les hormones polypeptidiques nommées neurégulines (NRG), hérégulines (HRG) ou *neu differentiation factor* (NDF). Quatre gènes ont été identifiés pour les hérégulines (HRG 1-4) et il existe des isoformes α et β pour HRG-1 et HRG-2 (137,138). Les HRG-1 et HRG-2 lient les récepteurs ErbB3 et ErbB4 tandis que les HRG-3 et HRG-4 lient seulement ErbB4 (127). Les motifs de HRG-1 servant à lier les récepteurs ErbB3 ou ErbB4 se situent dans la région N-terminale du ligand tandis que la portion C-terminale est responsable du recrutement du partenaire de dimérisation (136,139).

Les ligands permettent l'activation des récepteurs mais peuvent aussi être impliqués dans l'inhibition de l'activité du récepteur par un processus de dégradation. La capacité de dégradation des ErbB varie selon le membre de la famille. Dans le cas d'ErbB1, la liaison d'un ligand comme l'EGF provoque un regroupement des récepteurs au niveau des puits à clathrine de la membrane plasmique. S'ensuit une étape d'invagination de la membrane pour former des vésicules endocytiques comprenant le complexe récepteur/ligand. Les vésicules endocytiques mûrent en endosomes où le pH interne est diminué et où il y a accumulation d'enzymes hydrolytiques qui dégradent les récepteurs. L'activation continue de la phosphorylation des résidus tyrosines à l'intérieur même de l'endosome mène au recrutement d'une ubiquitine ligase appelée c-Cbl. Cette enzyme lie les homodimères ErbB1 de façon préférentielle (140). c-Cbl catalyse l'apposition de chaîne de polyubiquitine sur le récepteur dirigeant celui-ci vers une dégradation lysosomale (141). Pour les autres membres de la famille ErbB, le processus d'endocytose est altéré de sorte que les trois autres récepteurs sont plutôt recyclés à la surface (142). Lorsque ErbB2 est présent dans l'hétérodimère, le niveau d'endocytose diminue et le recyclage du partenaire de dimérisation est favorisé (143).

3. Signalisation intracellulaire engendrée par les ErbB

La signalisation engendrée par les ErbB est dépendante de plusieurs facteurs tels que la nature du ligand, la composition du dimère et les déterminants structuraux des récepteurs impliqués. Un ligand lié à un dimère entraîne un patron de

phosphorylation particulier sur la portion intracellulaire du récepteur et par conséquent, il y a recrutement des protéines de signalisation intracellulaire qui correspondent à ce patron de phosphorylation (116,144). Ainsi, les différents patrons de résidus tyrosine phosphorylés recrutent diverses molécules possédant des domaines SH2 et/ou PTB amenant ainsi la signalisation à un niveau supérieur de complexité (144).

Plusieurs voies de signalisation sont activées suite à la liaison du ligand au récepteur ErbB. La voie des MAP kinases ainsi que celles impliquant PI3-kinase/Akt, la PKC et p70S6K/p85S6K sont utilisées pour une majorité de dimères ErbB (116). L'activation de ces voies de signalisation entraînent l'activation de facteurs de transcription tels que c-fos, c-jun, c-myc, Sp1 (*specificity protein 1*), Egr1 (*early growth response 1*) (116) et GABP (*growth-associated binding protein*) (145). Les facteurs de transcription ainsi activés initient l'expression de gènes cibles et par conséquent modulent le comportement de la cellule suite à un stimulus externe.

La composition du dimère est déterminante pour la signalisation intracellulaire résultante. Certains récepteurs peuvent s'associer à des molécules adaptatrices particulières tandis que d'autres n'en sont pas capables. Par exemple, ErbB3 ne peut s'associer à l'ubiquitine ligase c-Cbl, à Grb2, à la phospholipase C γ et à la protéine GAP (protéine activant spécifiquement la GTPase Ras) mais peut se lier aux protéines adaptatrices Shc et Grb7 (146). De plus, de tous les membres de la famille ErbB, ErbB3 est le meilleur activateur de la voie PI3-kinase puisqu'il possède plusieurs sites de liaison pour la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase contrairement à ErbB2 (147). La transduction du signal de ErbB2 par la voie PI3-kinase passe préférentiellement par l'hétérodimérisation avec ErbB3 (148).

Les combinaisons homodimériques entre ErbB sont considérées moins mitogéniques et moins transformantes que les hétérodimères. La présence de ErbB2 dans le complexe entraîne une activation accrue des voies de signalisation comme celle des MAP kinases (149-151) entre autre parce qu'il diminue le taux de

dégradation des ErbB (132). De plus, les hétérodimères peuvent acquérir de nouvelles propriétés de signalisation que celles associées aux récepteurs individuels. Par exemple, alors que les homodimères ErbB2/ErbB2 et ErbB4/ErbB4 provoquent une forte activité de la voie des MAP kinases, l'hétérodimère ErbB2/ErbB4 est capable également de stimuler l'activité du facteur de transcription Stat5 (un membre de la famille Stat c'est-à-dire *signal transducer and activator of transcription*) (152). Il a été rapporté que l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 représente la forme la plus transformante et la plus mitogénique en plus d'être capable d'augmenter la mobilité cellulaire (150,153-155).

4. Rôles physiologiques des récepteurs ErbB et de leurs ligands

Les récepteurs ErbB et leurs ligands sont impliqués dans une panoplie de phénomènes biologiques tels que le développement ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaires. Cette variété de phénomènes est causée par les différentes fonctions des récepteurs et de leurs ligands.

Des études d'inactivation du gène ErbB1 chez la souris montrent une déficience dans le développement épithélial de plusieurs organes et provoque également un problème au niveau de l'ouverture des yeux (156-158). La souris *knock out* de ErbB1 montre une apoptose massive des régions corticales et thalamiques du cerveau (158). Étrangement, la souris *knock out* de TGF α (*transforming growth factor alpha*), un ligand de ErbB1, ne montre pas d'anomalie évidente au cerveau (159,160). Ces observations suggèrent que chaque ligand a un rôle fonctionnel distinct et possède une action tissu-spécifique. Des études utilisant des souris transgéniques et des expériences *in vitro* suggèrent que ErbB1 est impliqué dans la différenciation des composantes épithéliales de la peau, des poumons, du pancréas et du tractus gastrointestinal (157,161). Il a été proposé que ce processus de différenciation est probablement régulé par des facteurs de croissance issus du mésenchyme adjacent (116).

Les hérégulines et leurs récepteurs correspondants soient ErbB3 et ErbB4 sont impliqués dans l'interaction entre les nerfs et les cellules associées telles que les cellules musculaires, les cellules gliales ainsi que les cellules de Schwann (116). Ils jouent également un rôle essentiel dans le développement cardiaque et neural. En effet, l'ablation génétique de ErbB2, ErbB4 ou NRG-1 provoque une mort intra-utérine suite à des déficiences cardiaques et à une altération au niveau du développement neural (162-165). NRG-1, ErbB2 et ErbB4 sont tous exprimés dans les myocytes pour initier la formation de la trabeculae, une projection linéaire de cellules musculaires cardiaques (166,167). La souris *knock out* de ErbB3 est également non viable au stade embryonnaire et souffre elle aussi de malformations cardiaques (168,169). Les souris homozygotes pour ErbB2, ErbB3 ou héréguline sont sévèrement atteintes au niveau de la chaîne de ganglions sympathiques. Il a été suggéré que cette observation est causée par une altération de la migration des progéniteurs neuraux à partir de la crête neurale (168). La crête neurale se définit comme un groupe de cellules embryonnaires qui se séparent de la plaque neurale et qui migrent à des endroits précis pour donner naissance aux nerfs, crâniens et rachidiens, aux ganglions associés à ces nerfs, aux ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale, à la médulla des glandes surrénales ainsi qu'à une partie de certains tissus conjonctifs. Certaines études *in vitro* démontrent que l'héréguline facilite la différenciation des progéniteurs de la crête neurale en cellules gliales et il a été observé que les souris *knock out* de ErbB3 montrent une diminution du nombre de cellules de Schwann autour des neurones périphériques et afférents (169,170). De plus, il a été démontré que l'héréguline régule l'expression de plusieurs canaux ioniques impliqués dans les jonctions neuromusculaires (171).

En plus de jouer un rôle dans les étapes du développement intra-utérin, les récepteurs ErbB sont également impliqués au niveau de l'évolution et la croissance de la glande mammaire. En effet, les cellules de cet organe prolifèrent et se différencient également après la naissance. À la naissance, la glande mammaire possède un système de canaux rudimentaire. Lors de la puberté, il y a développement de la glande suite à l'action d'hormones stéroïdiennes et peptidiques. Durant la

grossesse, il y a prolifération des cellules au niveau des alvéoles lobulaires de la glande. Lors de l'accouchement, le coussin adipeux mammaire est complètement rempli d'unités d'alvéoles lobulaires productrices de lait (172,173). Dans la glande mammaire, les quatre types de récepteurs ErbB sont exprimés selon le type cellulaire et le stade de développement. Les souris déficientes en ErbB1 montrent une croissance rudimentaire des canaux de la glande (174,175). ErbB2 est exprimé à tous les stades de développement de la glande mammaire (173). L'expression d'un dominant négatif de ErbB2 chez des souris transgéniques montre une formation normale des canaux mais des alvéoles lobulaires défectueuses avec une diminution de la sécrétion de protéines du lait (176). Tout comme ErbB2, l'expression d'une forme dominante négative de ErbB4 mène à un processus de lactation inapproprié (177). Finalement, bien que ErbB3 soit exprimé à plusieurs étapes de développement de la glande mammaire, ses fonctions biologiques ne sont pas encore élucidées.

5. La dérégulation pathologique des ErbB

La dérégulation dans l'expression des ErbB est fortement associée à plusieurs formes de cancer. En effet, les signaux prolifératifs produits par les ErbB sont utilisés dans la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Généralement, les ErbB sont hyperactivés dans un contexte cancéreux en raison d'une surproduction de ligand, d'une surexpression du récepteur ou d'une activation constitutive du récepteur.

Dans le cas du récepteur ErbB1, plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine d'une surproduction de ligand de ErbB1. Par exemple, TGF- α , un ligand de ErbB1, peut être surexprimé suite à l'activation de l'oncogène K-ras (178). Également, le stroma ainsi que la tumeur elle-même constituent une source de ligand de ErbB1. Le stroma se décrit comme un tissu conjonctif qui comprend un épithélium glandulaire et dont la fonction est le support. Par ailleurs, la surexpression de ErbB1 ainsi que des altérations du récepteur sont fréquemment rencontrées dans les tumeurs malignes humaines (116). Une amplification du gène codant pour ErbB1 conduisant à la surexpression du récepteur, est présente dans 40% des gliomes (179).

Une amplification génique constitue en une augmentation différentielle d'une portion spécifique du génome qui est associée à une transformation néoplasique et à l'acquisition d'une résistance aux médicaments. Les gliomes sont des tumeurs primitives de l'encéphale et de la moelle épinière, développées à partir d'une des nombreuses lignées cellulaires formant le parenchyme du cerveau, de la moelle, de la neurohypophyse, de l'épiphyse et de la rétine. Le parenchyme se définit comme étant l'ensemble des tissus fonctionnels d'un organe. Il a été suggéré suite à des études *in vitro* que la surexpression de ErbB1 de type sauvage mène à la transformation seulement si le ligand est présent (116). L'amplification génique de ErbB1 est habituellement accompagnée de réarrangements génétiques. La mutation la plus fréquemment rencontrée est celle où le domaine extracellulaire est partiellement tronqué ce qui a pour conséquence de former un récepteur constitutivement actif (116,180). Cette altération a été retrouvée dans différents cancers dont ceux atteignant les poumons, la prostate, les ovaires et le sein (181,182).

Certains virus oncogéniques ciblent les récepteurs ErbB, plus particulièrement le récepteur ErbB1, afin de favoriser la progression des cellules saines en cellules malignes. Par exemple, le virus de l'hépatite B, associé au carcinome hépatocellulaire, augmente la transcription de ErbB1 (183). Le virus d'érythroblastose aviaire, quant à lui, code une forme tronquée du récepteur ErbB1 où une grande partie du domaine extracellulaire est manquant. Le récepteur ainsi muté forme des dimères liés de façon covalente à la surface cellulaire qui occasionnent une signalisation intracellulaire ligand-indépendante (184).

La surexpression de ErbB2 est associée à plusieurs formes de cancers et il a été rapporté que les tumeurs ErbB2 positives prédisposent à un mauvais pronostic et ce, plus particulièrement dans les cancers mammaires et ovariens (185,186). En effet, il a été observé que 15-30% des cancers du sein canaux invasifs montrent une amplification du gène codant pour ErbB2 (187). La surexpression de ErbB2 a été corrélée avec plusieurs facteurs biologiques et cellulaires reliés au cancer du sein comme la taille de la tumeur, l'étendue du cancer aux ganglions lymphatiques, un

grade élevé de malignité, une augmentation des cellules en phase S, une aneuploïdie c'est-à-dire un nombre anormal de chromosomes causé par une mauvaise ségrégation lors de la division cellulaire ainsi qu'une faible expression des récepteurs stéroïdiens. Nombre de ces facteurs sont des conséquences de la rapidité de prolifération que la surexpression de ErbB2 provoque chez les cellules cancéreuses. Cependant, il est important de mentionner que l'altération de ErbB2 seule est insuffisante pour que les cellules saines deviennent malignes (185). Toutefois, il a été proposé que la surexpression de ErbB2 entraîne une activation ligand-indépendante du domaine tyrosine kinase suite à une formation spontanée de dimère (173). En plus de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses, la surexpression de ErbB2 affecte la différenciation morphologique cellulaire et augmente le potentiel de migration et d'invasion des cellules (188,189).

Outre l'amplification génique de ErbB2 dans le cancer, une variante oncogénique a été identifiée à partir de tumeurs neuroectodermes du rat. Il s'agit d'une mutation dans le domaine transmembranaire où le résidu valine en position 664 est remplacé par l'acide aminé acide glutamique. Cette mutation mène à une activation constitutive du récepteur (190,191). Une mutation similaire chez l'humain n'a pas été identifiée jusqu'à présent (192).

La signalisation intracellulaire occasionnée par la surexpression de ErbB2 cible plusieurs effecteurs nucléaires. En effet, l'activation de ErbB2 entraîne l'expression de c-myc et des cyclines de type D, module l'activité du complexe cycline E/CDK2 et provoque la séquestration ainsi que la dégradation de l'inhibiteur de kinase dépendante de cycline (CDK) p27^{KIP1} (193-195). L'activation de la voie PI3-kinase due à la signalisation accrue de ErbB2 permet la phosphorylation de p27^{KIP1} par Akt et entraîne sa séquestration dans le cytoplasme, l'empêchant d'exercer son rôle d'inhibiteur du complexe cycline E/CDK2 et par conséquent, d'inhiber la poursuite du cycle cellulaire (196-198). Somme toute, l'ensemble de ces modifications a pour effet de promouvoir l'entrée et la progression du cycle cellulaire.

Plusieurs études montrent que la surexpression de ErbB2 est associée à une résistance aux thérapies antiestrogéniques dans les cancers du sein ER positifs (199). En effet, les patientes atteintes d'un cancer du sein qui surexprime ErbB2 répondent moins bien au traitement au tamoxifène (200). Certaines études rapportent qu'en plus de conférer une résistance aux antiestrogènes, la surexpression de ErbB2 rend les cellules cancéreuses insensibles aux estrogènes et confère ainsi une prolifération indépendante des estrogènes. Ce phénomène a aussi été observé dans les cas de surexpression d'héréguline (201). De façon surprenante, le traitement aux estrogènes s'oppose à la surexpression de ErbB2 en supprimant la transcription du gène codant pour ErbB2 (202,203) et inhibe ainsi la croissance des cellules cancéreuses surexprimant ErbB2 (204).

Contrairement à ErbB1 et ErbB2, aucune amplification génique de ErbB3 n'a été mise en évidence jusqu'à ce jour. La progression d'un cancer n'est habituellement pas attribuée à l'unique surexpression de ErbB3 (116,204). Certaines études montrent une diminution de l'expression du récepteur ErbB4 dans les cancers du sein et de la prostate par opposition aux tissus sains correspondants (116,205). L'expression de ErbB4 est associée à un phénotype histologique relativement différencié (206).

Comme il a été mentionné précédemment, l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 est celui qui montre le plus fort potentiel mitogénique. De plus, l'expression de ErbB3 accompagne souvent la surexpression de ErbB2 comme il a été montré pour le cancer du sein et de la vessie ainsi que pour certains cas de mélanomes (207-210). Les tumeurs qui surexpriment ErbB2 montrent une augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosine sur ErbB3 (153). Ainsi, il a été suggéré que dans un contexte où ErbB3 est exprimé et que ErbB2 est surexprimé, il y a une dimérisation spontanée entre ces deux types de récepteurs. Il a également été rapporté que l'héréguline et les récepteurs ErbB2 et ErbB3 forment une boucle d'activation paracrine dans le cancer de la prostate (211).

Au niveau moléculaire, certaines évidences permettent de suggérer que l'activation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 contribue à la prolifération tumorale incontrôlée. Il a été montré que l'activation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 dérégule la transition des phases du cycle cellulaire G1/S en modulant l'activation du complexe formé par Cycline E/CDK2 qui permet l'entrée en phase S de la cellule (194). Par ailleurs, un récepteur ErbB2 inactif dans les cellules cancéreuses provoque une baisse de l'activation de la voie PI3-kinase/Akt et diminue la prolifération cellulaire (194,212). Cependant, ErbB2 ne peut pas recruter la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase alors il doit se dimériser avec un partenaire qui détient au moins un site de liaison pour cette protéine (173). Il a été démontré que ErbB3 possède six sites de liaisons de p85 (213) et que l'inactivation de ErbB2 fait diminuer la phosphorylation des résidus tyrosine de ErbB3 (194,214-216). Lorsque ErbB3 est inactivé, une inactivation de la voie de PI3-kinase et une baisse de l'expression de la cycline D sont observées (148). Ces observations suggèrent que l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 fonctionne comme unité oncogénique qui promouvoit la prolifération de cellules tumorales de la glande mammaire (148).

D'autres pathologies que le cancer impliquent un rôle pour les ErbB. Par exemple, la migration des cellules musculaires lisses vasculaires dans l'intima artérielle contribue à un mauvais fonctionnement cardiovasculaire. Pour que ce phénomène se produise, il faut que le récepteur de la thrombine soit activé. L'activation de ce récepteur couplé à une protéine G dépend de la transactivation de ErbB1 (217). De plus, dans les cas de psoriasis, une surexpression de ErbB1 et d'un de ses ligands, l'amphireguline, sont retrouvées dans les différentes couches de l'épiderme contrairement à la peau normale où ErbB1 est exprimé seulement dans la couche basale (218).

6. Approches thérapeutiques ciblant les récepteurs ErbB

Plusieurs approches thérapeutiques sont développées afin d'enrayer l'activation dérégulée des récepteurs ErbB dans les cancers. La majorité des

stratégies ciblent les récepteurs ErbB1 et ErbB2 dont la surexpression est fortement associée au potentiel oncogénique.

Une des approches est l'utilisation d'anticorps pour bloquer l'activation des ErbB. Un anticorps monoclonal dirigé contre ErbB1 appelé C225 entre en compétition avec le ligand (219) en plus d'altérer la fonction du récepteur (220). Il a été montré que l'anticorps anti-ErbB1 C225 provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en raison d'une augmentation de l'inhibiteur de CDK p27^{KIP1} (221). Parmi les anticorps dirigés contre les récepteurs ErbB, le plus connu est sans doute l'anticorps monoclonal dirigé contre ErbB2 ou herceptin® qui a été approuvé pour utilisation en essai clinique. Au niveau moléculaire, il a été montré que l'utilisation de l'herceptin® faisait diminuer la quantité de récepteurs ErbB2 à la surface cellulaire et qu'une augmentation de p27^{KIP1} ainsi que de p130, une protéine de la famille pRb, étaient observées. Cela a pour effet de réduire le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire et ainsi de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses (222). L'herceptin® permet le recrutement de cellules effectrices du système immunitaire aux cellules cancéreuses (223). Parmi les autres approches immunologiques, l'utilisation d'anticorps toxiques pour les cellules cancéreuses en étant conjugués à des composés radioactifs, des toxines ou des prodrogues sont considérées (116). Des protocoles d'immunisation contre certaines portions de ErbB2 sont aussi étudiés (224).

Des petites molécules inhibitrices sont également synthétisées afin de contrevenir au bon fonctionnement des ErbB ou des voies de signalisation engendrées par l'activation de ceux-ci. Parmi ces molécules, les inhibiteurs de tyrosine kinase inhibent directement la phosphorylation des ErbB en interagissant directement avec le site liant l'ATP et/ou empêche la tyrosine kinase d'effectuer sa réaction enzymatique (225). Les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant les ErbB et dont les études cliniques sont les plus avancées sont le ZD1839 et le OSI-774 qui ciblent ErbB1 et qui sont présentement en phase III. Il y a aussi le CL-1033 qui cible l'ensemble des récepteurs ErbB et qui fait l'objet d'études de phase I. Le PKI-166 et le GW-2016

ciblent ErbB1 et ErbB2 et sont en phase I et finalement le EB-569 qui cible ErbB1 et qui est également en phase I (226). D'autres molécules telles que la geldanamycine inhibent les protéines chaperones, comme la Hsp90, qui, habituellement, conduisent les nouveaux récepteurs ErbB du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (227).

La thérapie génique est elle aussi considérée pour bloquer l'activité des ErbB. Le produit du gène E1A de l'adénovirus de type 5 peut bloquer la surexpression de ErbB2 et supprimer son potentiel cancérigène dans le cancer ovarien et mammaire (228). Cependant, il semble que les résultats escomptés devront attendre encore car peu d'études cliniques utilisent la thérapie génique (229). Par ailleurs, les approches utilisant des antisens, des dominants négatifs des récepteurs ainsi que des ribozymes spécifiques s'avèrent prometteuses pour bloquer l'expression et l'activité des récepteurs dans des cellules en culture (230-232).

Il est possible d'utiliser le réseau ErbB dans le but de remédier à certains problèmes cliniques. Par exemple, il a été montré que l'héréguline est mitogène pour les cellules de Schwann (233). Ainsi, l'utilisation de l'héréguline pourrait aider à guérir des blessures atteignant les circuits nerveux (234).

C. But et hypothèse de recherche

Plusieurs évidences tendent à établir un lien entre les voies de signalisation des estrogènes et celles des récepteurs de la famille des ErbB. Dans un premier temps, il a été démontré que les deux isoformes des récepteurs des estrogènes ER α et ER β peuvent être activés par un ligand de ErbB1, le facteur de croissance EGF, suite à une cascade de phosphorylation où les MAP kinases sont impliquées. Cette phosphorylation a lieu dans le domaine d'activation AF-1 des récepteurs et elle est responsable de l'activité ligand-indépendante des ER (68,95,101). Vu la faible homologie de séquence au niveau de l'AF-1 qui existe entre les deux récepteurs (15-17%), il est fort probable que l'activité des deux isoformes soit régulée différemment

suite à divers stimuli ciblant la fonction AF-1 des récepteurs. En effet, en plus d'une redondance dans la réponse aux estrogènes, les deux types de récepteurs semblent également avoir des rôles physiologiques distincts et peuvent ainsi agir différemment au niveau moléculaire selon la nature du ligand, les modifications post-traductionnelles, les interactions avec les divers corégulateurs ainsi que le contexte des promoteurs de gènes cibles (37). Par exemple, la phosphorylation des résidus sérines 106 et 124 présents dans l'AF-1 de ER β permet le recrutement des coactivateurs SRC-1 et CBP (68,103). La sérine 118 de ER α , quant à elle, ne serait pas impliquée dans le recrutement de ces coactivateurs (235).

D'autres éléments suggèrent l'existence d'une interrelation entre les voies des récepteurs des estrogènes et celles des récepteurs ErbB. Il a été rapporté qu'après les premiers stades de progression tumorale de la glande mammaire, une résistance aux hormones stéroïdiennes accompagnée d'une surexpression de récepteurs de facteurs de croissance est observée (60). Une surexpression de ErbB2 dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire appelée MCF-7 provoque une diminution de l'expression de ER et diminue l'activité transcriptionnelle ERE-dépendante (236). Il a aussi été montré que ER module l'expression de ErbB2 et que le promoteur du gène codant pour ce dernier possède un élément de réponse aux estrogènes (201,237). De plus, une surexpression de ErbB2 provoque une augmentation de l'expression de MTA1s, une variante du corépresseur MTA1, ce qui entraîne une séquestration cytoplasmique de ER α et empêche ainsi la translocation nucléaire ligand-dépendante du récepteur (238).

La surexpression de ErbB2 n'est pas unique dans la régulation de l'activité des récepteurs des estrogènes par les ErbB. Parmi tous les dimères de ErbB possibles, l'hétérodimère constitué de ErbB2 et ErbB3 forme l'unité la plus transformante et la plus mitogénique (153,154,239). Une étude menée par Tang et al. en 1996 montre que l'héréguline, un ligand de ErbB3 et de ErbB4, possède la capacité de diminuer considérablement la transcription ligand-dépendante de ER (236). Plus récemment, une autre équipe a proposé un mécanisme afin d'expliquer ce

phénomène soit que l'héréguline induit l'expression du corépresseur MTA1 ce qui a pour conséquence de diminuer la transcription ERE-dépendante de ER α en recrutant des HDAC (238). Concordant avec ces observations, il a été montré que la prolifération estrogène-dépendante des cellules exprimant ErbB2 et ER est diminuée en présence d'héréguline (240).

La majorité des travaux concernant la relation entre les récepteurs des estrogènes et les ErbB ont porté sur ER α . Étant donné que les effets de la signalisation des ErbB sur la réponse aux estrogènes de ER β sont moins caractérisés que sur celle de ER α et que plusieurs différences entre les deux isoformes de récepteurs sont répertoriées, le but principal du projet de recherche faisant l'objet de ce mémoire est d'étudier l'effet de la signalisation du dimère composé de ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des estrogènes β . L'hypothèse de recherche est que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 module l'activité transcriptionnelle de ER β selon un mécanisme différent de celui observé chez ER α .

Pour atteindre cet objectif principal, il faut dans un premier temps établir l'effet de l'héréguline, connu pour activer le dimère ErbB2/ErbB3, sur l'activité ligand-dépendante et indépendante de ER β ainsi que l'impact sur la prolifération cellulaire. La ou les voie(s) de signalisation impliquée(s) dans ces effets doivent également être déterminées. Par la suite, il faut identifier quelle région de ER β est concernée dans l'effet de l'héréguline et finalement évaluer le rôle possible des corégulateurs dans ce phénomène.

II. MÉTHODOLOGIE

Le projet de recherche vise donc à établir le rôle de la signalisation de l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle de ER β . Ces études nécessitent des modèles cellulaires où l'expression de ErbB2, ErbB3, ER α et ER β est absente, soit les cellules embryonnaires de rein humain appelées 293T, ou présente de façon endogène comme les cellules MCF-7. Les MCF-7 sont des cellules cancéreuses de la glande mammaire. Ces cellules ont été transfectées de façon transitoire selon la méthode de précipitation au chlorure de calcium. La mesure de l'activité transcriptionnelle de ER se fait par essai de cotransfection avec le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse aux estrogènes ERE ainsi qu'avec les plasmides d'expression des différents ErbB ou des récepteurs des estrogènes selon le besoin. Des cellules MCF-7 dans lesquelles le vecteur contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un ERE a été intégré de façon stable, ont aussi été utilisées. Les cellules sont ensuite traitées avec diverses hormones peptidiques appartenant à la famille des facteurs de croissance apparentés à l'EGF et avec du 17 β -estradiol afin d'activer respectivement le signal des ErbB et du récepteur des estrogènes. La mesure de l'activité de la luciférase est analysée par luminométrie sur les extraits cellulaires. L'efficacité de transfection est mesurée par l'activité de la β -galactosidase dont le plasmide contenant le gène a aussi été transfecté. Les résultats sont ainsi normalisés et présentés en unités RLU (*relative luciferase units*).

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'effet des facteurs de croissance sur l'activité des récepteurs des estrogènes, divers inhibiteurs synthétiques des différentes voies de signalisation des protéines kinases sont utilisés. Pour appuyer les résultats obtenus avec ces inhibiteurs, des mutants dominants négatifs et dominants positifs de certaines composantes des voies de signalisation sont également inclus dans les essais d'activité transcriptionnelle. De plus, des mutants de délétion et ponctuels des récepteurs des estrogènes ont également été

utilisés afin d'identifier la région de ER qui est responsable des effets de la signalisation du dimère ErbB2/ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle.

L'immunoprécipitation des récepteurs ErbB suivie de l'immunobuvardage montrant le niveau de phosphorylation de ceux-ci sont réalisés afin de mesurer les niveaux d'activité des récepteurs suite aux différents traitements. De plus, des immunobuvardages permettant d'évaluer l'activité de certaines voies de signalisation sont effectuées sur les extraits cellulaires préalablement traités.

Des essais de prolifération utilisant le MTT sont réalisées sur les cellules MCF-7 soumises à différentes combinaisons de traitements afin d'évaluer l'impact de l'héréguline et des voies des MAP kinases et de la PI3-kinase sur la prolifération estrogène-dépendante.

Finalement, des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChiP) sont réalisés sur des extraits cellulaires de cellules MCF-7 afin d'évaluer l'effet des divers traitements sur l'occupation du promoteur d'un gène cible de ER, le gène *eb1*, par les récepteurs ER α et ER β .

III. ARTICLE SCIENTIFIQUE

A. Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant

Véronique St-Laurent
M. Sc. Sciences biomédicales

2. Description de l'article

L'article qui est l'objet de ce mémoire se décrit comme suit :

St-Laurent, V., Sanchez, M., Charbonneau, C. et Tremblay, A. *The Hormone-Dependent Activity of Estrogen Receptor Beta is Altered by a p38-Dependent ErbB2/ErbB3 Signaling to the AF-1 Domain.*

La revue pour laquelle l'article sera soumis est *Molecular Endocrinology*.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Véronique St-Laurent inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Effet de la signalisation de ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes et sur la prolifération cellulaire

Mélanie Sanchez
Coauteur


Signature

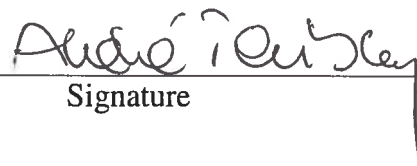
23 juin 2004
Date

Catherine Charbonneau
Coauteur


Signature

23 juin 2004
Date

André Tremblay
Coauteur


Signature

23 juin 04
Date

B. The Hormone-Dependent Activity of Estrogen Receptor Beta is Altered
by a p38-Dependent ErbB2/ErbB3 Signaling to the AF-1 Domain

The Hormone-Dependent Activity of Estrogen Receptor Beta is Altered by a p38-Dependent ErbB2/ErbB3 Signaling to the AF-1 Domain

**Véronique St-Laurent¹, Mélanie Sanchez², Catherine Charbonneau²,
and André Tremblay^{1,2}**

*Ste-Justine Hospital Research Center, and Departments of Obstetrics & Gynecology¹, and Biochemistry², University of Montreal, Montréal, Québec, Canada
H3T 1C5*

keywords: estrogen receptor; ER α ; ER β ; AF-1; AF-2; MAPK; p38; growth factors; heregulins; ErbB2/HER-2; ErbB3; MCF-7; SRC-1

short title: AF-1 mediated regulation of ER β AF-2 activity by ErbB2/ErbB3

Correspondence should be addressed to:

André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada. Phone: (514) 345-4931 x2830. Fax: (514) 345-4988. [REDACTED]

ABSTRACT

Deregulated signaling of ErbB2/HER-2 receptor tyrosine kinase activity is often associated to hormone resistance in estrogen receptor (ER) alpha positive breast cancers, therefore establishing a relationship between ErbB2 and ER α pathways. Although ER β is expressed in many breast cancer cells, the response of ER β to ErbB2 signaling is however less well defined. In the present study, we demonstrate that ER β activity can be modulated by ErbB2 signaling in ER-expressing breast cancer cells. The estrogen-dependent transcriptional activity of ER β was altered in a manner similar to ER α by either activation of ErbB2/ErbB3 signaling by growth factor heregulin β or expression of an activated tyrosine kinase mutant of ErbB2. However, as opposed to ER α , the repression of liganded ER β activity by ErbB2 signaling was found to be dependent on the p38 MAPK pathway and, as determined by ChIP assay, p38 activity was involved in regulating estrogen-responsive gene promoter occupancy by ER β in heregulin-treated cells. In addition, the repression in ER β response to hormone was dependent upon its AF-1 domain and was further ascribed to a discrete region within AF-1 that we previously showed to contain serines 106 and 124, two phosphorylation target sites for MAPK involved in coactivator SRC-1 recruitment to ER β . Interestingly, substitution of these two serines by aspartic acid residues abolished the repression of ER β by activated ErbB2/ErbB3, while replacement with alanines did not result in significant changes. Likewise,

expression of SRC-1 was preferentially relieving the inhibition of liganded ER β compared to other coactivators in heregulin-treated cells. Our studies demonstrate a functional coupling between ER β and ErbB receptors, and outline the differential role for the AF-1 region to regulate estrogen-dependent cell growth and activity of both estrogen receptors.

INTRODUCTION

Growth and differentiation of both normal and malignant human breast cancer cells are regulated by steroid hormone and peptide growth factor receptors. As such, members of both receptor classes are considered as strong prognostic factors for a subset of mammary tumors to predict for a beneficial response to therapy.

The expression of estrogen receptor (ER) is found in more than 60% of human breast tumors and strongly correlates with a favorable response to hormone treatment. Estrogen effects are known to be transduced by two forms of estrogen receptor, ER α and ER β , which belong to the nuclear receptor superfamily of ligand activated transcription factors (45). Both forms are structurally related and act as homo- or heterodimers to transduce estrogen-dependent target gene expression by binding to specific response elements in promoter regions (84,241,242). Upon ligand binding, transcriptional activation of ER α and ER β involves recruitment of coactivators such as the SRC family members and CBP/p300 to activate the receptor activation function AF-2 and initiate transcription (48,243). Both ER α and ER β are also regulated by growth factors that target mostly the AF-1 domain to result in receptor phosphorylation and subsequent transactivation (43,244). In particular, specific residues within the AF-1 domain of both ER α and ER β have been identified as target sites for protein kinase signaling cascade, such as the MAPK and the PI3K/Akt pathways, thereby promoting AF-1 mediated activation (95,101,103,108). These effects can either synergize with the AF-2 mediated response or act independently

from estradiol activation, depending on the promoter and cell type context. Despite an initial benefit in breast cancer patients under hormonal therapy such as tamoxifen, ER-positive tumors often develop a hormone resistance phenotype resulting in more aggressive cancers (245). Signaling by growth factors such as EGF, IGF-1 and heregulin was shown to promote estrogen-independent growth properties of ER-positive breast cancer cells (95,246-249), thereby suggesting that deregulation in receptor tyrosine kinase receptor signaling might affect ER activity.

The ErbB family of growth factor receptor tyrosine kinases includes ErbB1/EGFR, ErbB2/HER-2/Neu, ErbB3 and ErbB4. ErbB receptors are essential mediators of cell proliferation and differentiation in the developing embryo and in adult tissues, and their inappropriate activation is associated with the development and severity of many cancers (116,192). Overexpression of ErbB2, found in 20-30% of breast cancers, is considered highly oncogenic and therapies directed against ErbB2 have shown promising results (250-252). Additionally, both clinical and laboratory data suggested that ErbB2 overexpression may contribute to hormone resistance in breast cancers, therefore establishing a relationship between ErbB2 and ER pathways. Despite an inverse correlation between ErbB2 and ER α expression found in many mammary tumors, loss of ER signaling is not always related to antiestrogen resistance, as both tamoxifen-resistant tumors and breast cancer cell lines often demonstrate sustained ER content and responsiveness to pure antiestrogens (253,254). However, tumors that are ER α and ErbB2-positive respond less to endocrine treatment (255), and overexpression of ErbB2 in estrogen-dependent tumor cells was shown to promote ligand-independent downregulation of ER α (201).

Hormone responsive breast cancer MCF-7 cells overexpressing ErbB2 were shown to become resistant to tamoxifen (256) and exhibit estrogen-independent growth (257), an effect abolished by the inhibition of MAPK (258). Increased MAPK activity has been observed in estrogen-unresponsive and ErbB2 expressing cell lines (259,260). These data thus suggest that ErbB2 signaling may regulate ER α activity in a hormone-independent manner by kinase activation pathways. However, despite the expression of ER β in most breast cancer cells, its involvement in breast cancer remains uncertain and studies are still controversial on whether ER β expression correlates with a protective role or not (245,261). In that respect, the response of ER β to ErbB2 signaling has not been clearly addressed.

Although no ligand has as yet been identified for ErbB2, ligand-dependent activation of ErbB2 signaling can occur through dimerization with the other ErbB members. As such, ErbB2 is the preferred dimeric partner of ErbB3 and ErbB4 which renders such dimers responsive to mesenchymal growth factor heregulins. Heregulin family members, also known as Neu differentiation factor neuregulins, by variously interacting with ErbB receptors, can elicit a plethora of cellular responses which includes proliferation, differentiation, apoptosis and survival (116). Isoform-specific effects but also functional redundancy have been reported for heregulins/neuregulins and shown to involve both temporal and differential regulation of signaling cascades (137,262,263). In particular, heregulin β was shown to promote cell cycle progression and mitogenic stimulation of breast cancer cells by triggering both the PI3K/Akt, the Erk/MAPK, and the p38 pathways, while EGF stimulation of cells was more dependent on the MAPK pathway (262,264). Interestingly, the same dimeric receptor

pair, such as was demonstrated for ErbB2/ErbB3 in breast cancer cells, can lead to various stimulation of MAPK and Akt pathways and regulate partially overlapping but distinct sets of genes in response to neuregulin isoforms (265). Different usage of the intracellular kinase pathways by activated ErbB receptors may therefore occur to transduce a growth factor effect into a cellular response.

In the present study, we report that ER β activity can be modulated by ErbB2 signaling in ER-expressing breast cancer cells. We show that ErbB2/ErbB3 dimer activation by heregulin repressed both the estrogen-dependent cell growth and activity of ER α and ER β . However, as opposed to ER α , the transcriptional repression of liganded ER β by heregulin was dependent upon ER β AF-1 function and involved the p38 MAPK pathway, thereby supporting a repressive role for AF-1 on ER β AF-2 mediated functions that could be relieved by coactivator recruitment.

RESULTS

Growth factors of the heregulin family decrease the response of ER to estrogen in MCF-7 cells.

The effects of EGF related growth factors heregulins were assessed on the transcriptional activity of ER in absence and in presence of estrogen. Using MCF-7 cells that were stably transfected to express a luciferase gene reporter under the control of an estrogen response element (266), we observed that treatment of cells with heregulin HRG α or HRG β resulted in a decrease of ER activity in response to estradiol (Fig.1A). HRG β was found more potent than HRG α in repressing ligand dependent activity of ER and the effect was dose-dependent in MCF-7 cells (Fig.1B). MCF-7 cells have been extensively used as a hormone-dependent breast cancer cell model known to express ER α but also ER β , and therefore are considered as ER-positive cells. By overexpressing ER α and ER β in transiently transfected MCF-7 cells, we found a similar decrease in the hormone-dependent activity of ER in response to HRG β compared to non transfected MCF-7 cells, suggesting that both ER isoforms could be subjected to the same downregulation by HRG β (Fig.1C).

ErbB2-ErbB3 dimer activity modulates ER response to estrogen.

The heregulin members of EGF related growth factors are known to interact preferentially with ErbB3 and ErbB4 receptors to elicit intracellular signals upon

receptor dimer activation. Although ErbB3 and ErbB4 can functionally heterodimerize, both receptors display a preference to ErbB2 as a sharing partner, of which the ErbB2/ErbB3 combination was reported to be highly mitogenic (137,148). To test whether ErbB receptor expression could modulate the response of ER to estrogens, we transfected human embryonic kidney 293 cells, which express ErbB receptor members at very low levels if not at all, with different combination of ErbB receptors and measured the effects on estrogen-dependent ER activity (Fig.2A). By transfecting ErbB2 and ErbB3 together, we could mimic the inhibitory effects of heregulin on ER β response to estradiol seen in MCF7 cells. These effects were not transduced using ErbB2 or ErbB3 alone, suggesting that ErbB2/ErbB3 dimer activity was responsible for the decrease in ligand-dependent activity of ER β . We also found that the combination of ErbB2/ErbB4 could as well mediate the repression effects of heregulin on ER β activity, although the effects were not as strong as for ErbB2/ErbB3 (data not shown). Heregulin had no effect on the estradiol-dependent activation of ER β in cells not transfected with ErbBs or transfected with ErbB1. We performed immunoprecipitation studies to ensure that transient transfection of ErbB2 and ErbB3 receptors in 293 cells could induce receptor activation upon heregulin treatment. As expected, transient expression of ErbB2 and ErbB3 increased both receptor tyrosine phosphorylation in response to heregulin, as opposed to mock-transfected cells in which no increase in ErbB2 and ErbB3 phosphorylation could be detected (Fig.2B and C). Aberrant signaling by ErbB2 overexpression has been associated to tumorigenesis in a number of patients with invasive breast cancer (192). Although not as yet found in humans, a point mutation replacing a valine residue to

glutamic acid at position 664 was described for rat Neu_T, the oncogenic variant of the rat ErbB2 equivalent, leading to constitutive receptor dimerization and activation (267). In order to mimic such activation, we generated the corresponding mutation (V659E) within human ErbB2 and tested the mutant for phosphotyrosine content. Results showed that transient expression of ErbB2 V659E mutant receptor in 293 cells resulted in a stronger increase in ErbB2 tyrosine phosphorylation, compared to wt ErbB2-expressing cells treated with heregulin (Fig.2B), indicating that the ErbB2 mutant behaves as a constitutively active receptor. When cells were cotransfected with ErbB3 and V659E ErbB2, phosphotyrosine content of ErbB2 was slightly decreased. Similarly, phospho-ErbB3 signal was also reduced by V659E expression as compared with wt ErbB2-expressing cells treated with heregulin (Fig.2C), suggesting that the V659E preferentially forms homodimers in transfected cells. In addition, a dominant negative form of ErbB2 was also generated by disrupting the tyrosine kinase activity with a K753A mutation. When expressed in 293 cells, the K753A mutant abolished ErbB3 activation by heregulin (Fig.2C). We therefore tested the effect of V659E expression on ER β activity and found that the activation of ER β by estradiol was inhibited by 56% in V659E-expressing cells (Fig.2D). These effects were similar to what we observed in heregulin-treated cells that expressed ErbB2 and ErbB3 (Fig.2A). Such repression in ER β activity was relieved in cells expressing the ErbB2 kinase dead K753A mutant, suggesting that ErbB2 signaling contributed to regulate ER β activity. We also found similar results for ER α for which the response to estradiol was also impaired by V659E expression (data not shown, see also Fig.3).

These results thus indicate that the ErbB2/ErbB3 dimer activity could modulate the estrogen-dependent activation of ER α and ER β .

ErbB2 V659E expression alters the ER-dependent activity to estrogen in MCF-7 cells.

In order to assess the role of ErbB2 activation on the estrogen response in ER positive cells, MCF-7 cells were transfected with the ErbB2 V659E mutant and tested for ER activity. V659E expression was found to decrease the effects of estradiol to levels similar to heregulin treatment, in MCF-7 cells stably expressing an ERE-Luc reporter (Fig.3A). Both ER α and ER β ligand-dependent activities were inhibited by V659E expression as indicated by a mammalian one-hybrid luciferase assay in MCF-7 cells expressing Gal4 fusion of each ER along with a UAS_{tk}Luc reporter (Fig.3B). The repression effects by activated ErbB2 on both ER isoforms were not however as strong as those observed in MCF-7 cells transfected with wt ErbB2/ErbB3 and treated with heregulin (Fig.3C). These apparent differences may reflect for a reduced efficacy of ErbB2 V659E to form homodimers in cells already expressing ErbB2 and ErbB3 receptors, as suggested by comparable levels of ErbB2 activation in heregulin-treated and in V659E expressing MCF-7 cells (Fig.3D). In addition, a role for ErbB3 activation to modulate ER activity can not be excluded based on levels detected in phospho-ErbB3 in heregulin-treated cells (Fig.3D).

The decrease of estrogen response of ER β by ErbB2/ErbB3 is AF-1 dependent.

Given the role of AF-1 function to regulate ER α and ER β response to EGF mediated signaling pathways (95,103), we next determined whether the AF-1 region was involved in ER α and ER β mediated response to heregulin by using truncated CDEF mutants. We found that removal of the N-terminal region of ER β abolished the inhibitory effect of heregulin observed on estradiol-mediated activation of full length ER β (Fig.4A). On the other hand, the absence of the N-terminal region of ER α did not affect the repression effect of heregulin. These results suggest an inhibitory role for AF-1 of ER β in modulating the response to hormone by heregulin which is apparently not shared with ER α AF-1. To further ascertain this apparent difference, we tested the response of Gal4 fusions of full length and truncated versions of ER α and ER β in ErbB2 V659E transfected 293 cells and found a similar requirement for ER β AF-1 in repressing ER β response to ligand as opposed to ER α (Fig.4B). Under conditions in which ER β response to ligand was found impaired by ErbB2/ErbB3 signaling, removal of the N-terminal region of ER β abolished these effects (Fig.4C). We next wanted to further delineate the region within the N-terminal domain of ER β responsible for the repressive effects of heregulin by measuring ligand-dependent activity of various truncated mutants upon heregulin treatment of ErbB2/ErbB3 transfected cells. As indicated in Fig.4D, removal of the region corresponding to positions 104 to 122 of ER β abolished the inhibitory effect of heregulin on ER β response to ligand, suggesting that this region may negatively regulate the AF-2

activity of ER β in these particular conditions. There is possibility that a AF-1 deletion alters the receptor expression and impairs the ligand-dependent response of ER β activity in ErbB2/ErbB3 transfected cells treated with heregulin. However, the region corresponding to positions 104 to 122 of ER β was also described to mediate activation of ER β AF-1 by growth factors such as EGF (68,103). Thus it seems that a shared region within ER β AF-1 can variously modulate receptor transactivation depending on which ligands of the EGF family is involved.

ErbB2/ErbB3 mediated repressive effects on ER β involves p38 activation.

Signaling by ErbB receptors is known to trigger activation of several protein kinase pathways, including the PI3K/Akt and ras/MAPK, to integrate growth factor stimulation into a cell cycle response (262). These pathways are however variously involved depending on the nature of the ligand and the receptor dimer formed. To determine the role for protein kinase pathways that may participate in the regulation of ER β activity by ErbB2/ErbB3 activation, we used various kinase inhibitors in our cotransfection assays and measured ER β activity. The decrease in ligand-dependent activity of ER β upon ErbB2/ErbB3 activation was partially relieved with MAPK inhibitors, with a stronger effect when p38 was inhibited (Fig.5A). Inhibition of p38 restored to 90% the ER β response to estradiol compared to 70% with Erk inhibition, while inhibiting Jnk had no significant effect. Inhibition of PI3K by wortmannin could not also restored to significant levels the response of ER β to estradiol in the presence of activated ErbB2/ErbB3. These results suggest that p38 activation is importantly involved to inhibit ER β by heregulin. Similarly, by expressing increasing

amounts of a K82R kinase inactivated form of MEK6, the p38 upstream kinase, the inhibitory effects of the constitutive ErbB2 V659E mutant on the response of ER to estrogen was restored in MCF-7 cells, as also did the p38 inhibitor SB203580 (Fig.5B). Interestingly, no significant effects were noticed by inhibiting p38 or Erk on ER α response to ligand in the presence of activated ErbB2/ErbB3 (Fig.5C). As the estradiol-mediated activation of the truncated CDEF α form was also impaired by heregulin (Fig.4), we also tested MAPK inhibition in cells transfected with CDEF α and found comparable results to full length ER α (Fig.5D). These findings thus suggest that inhibition of ER α and ER β by ErbB2/ErbB3 signaling might involve different cellular pathways from which the p38 activation pathway seems to target ER β but not ER α mediated transcriptional repression under ErbB regulation. To further assess the role for p38 activation on ER mediated response to hormone, we tested the expression of constitutive mutants specific for each MAPKs on ER driven transcriptional activity. We found that the response to estradiol was partially inhibited with the expression in MCF-7 cells of a MEK6glu constitutive mutant, described to specifically activate p38 (268), as opposed to moderately increased with expression of constitutive MEK1, the upstream kinase of Erk and Jnk (Fig.6A). We then transfected cells with ER α or ER β to test whether p38 activation could modulate ligand-dependent activity of each ER isoforms and found that ER β response to hormone was more affected compared to ER α with the expression of MEK6glu (Fig.6B and C). Under the same conditions, constitutive activation of Erk and Jnk by MEK1 was increasing the estrogen-dependent activation of both ER α and ER β . These results thus support a differential regulation of the estrogen responsiveness of

ER α and ER β by the p38 MAPK pathway and therefore provide a mean by which ErbB2/ErbB3 signaling might discriminate between both ER subtypes. Activation of p38 by ErbB2/ErbB3 dimer activity was evidenced in immunoblotting experiments using an anti-phospho-p38 antibody which could detect increased amount of activated p38 upon heregulin treatment of ErbB2/ErbB3 transfected cells (Fig.6D). Comparable amounts of activated p38 were also noticed between ErbB2 V659E and MEK6glu expressing cells, indicating that the constitutive mutant of ErbB2 was very potent in activating p38. Expression of ErbB2 V659E mutant also increased activated Erk and Akt content in transfected cells (data not shown).

Promoter occupancy by ER is variously regulated by p38

Having shown that ER-dependent hormone responsiveness was modulated by p38 activity through ErbB2/ErbB3 signaling in MCF-7 cells and that these effects were more related to regulation of ER β activity than to ER α in transfected cells, we sought to determine whether this apparent differential regulation would modulate target gene control of expression driven by both receptor subtypes. In order to assess for transcriptional control of ER-targeted genes, we analysed estrogen-responsive promoter occupancy by ER α and ER β using chromatin immunoprecipitation (ChIP) with antibodies against both forms of ER on MCF-7 cells. The presence of the specific promoter region of EB1, a gene known to be regulated by estrogen (269), in the immunoprecipitates was determined by semiquantitative PCR using a pair of primers spanning the estrogen responsive region as indicated in Fig.7. Treatment of MCF-7 cells with estradiol induced a dramatic increase in the occupancy by both ER α and ER β of the EB-1 promoter compared to barely undetectable levels in

untreated cells (Fig.7). Interestingly, ER α and ER β occupancies were also increased, although significantly less than with estradiol, upon treatment of MCF-7 cells with heregulin, suggesting that heregulin might regulate ligand-independent activity of ER. As such, we noticed slight activation levels of ER-dependent transcriptional activities in absence of hormone in cells in which ErbB2/ErbB3 signaling was activated (see Fig 2 and data not shown). However, in the presence of estradiol, heregulin induced a decreased EB1 promoter occupancy by both ER as expected from results obtained in reporter assays. Interestingly, when we tested the effects of MAPK inhibitors on promoter occupancy, we noticed that p38 inhibition abolished the decrease in liganded ER β occupancy by heregulin resulting in levels comparable to estradiol treatment alone. These effects were not seen for ER α for which EB1 promoter occupancy levels were not significantly modified by p38 inhibition in the presence of estradiol and heregulin. These results indicate that p38 activity is involved in the effects of heregulin to release liganded ER β from the estrogen responsive EB-1 promoter thus mediating the repressive effects of activated ErbB2/ErbB3 signaling. However, as suggested with the ChIP and also with our luciferase reporter assays, such modulation by ErbB2/ErbB3 on estrogen-mediated ER α activity is not p38 dependent. On the other hand, when the Erk inhibitor PD98059 was added to MCF-7 cells, both ER α and ER β occupancy levels to the EB-1 promoter were restored compared to cells treated with estradiol and heregulin, suggesting that Erk activity was involved in the effects of heregulin. We cannot therefore exclude a possible role for Erk in mediating the effects of ErbB2/ErbB3 on ER activity although such effects do not seem to be ER isoform-specific.

p38 activity is required to inhibit estrogen-dependent proliferation of MCF-7 cells by heregulin

Our data show that ErbB2/ErbB3 dimer activation by heregulin contributes to down regulate both ER α and ER β activity in the presence of hormone and that repression of ER β is relieved by p38 inhibition. This raises the question of whether such regulation on ER responsiveness to heregulin might impact breast cancer cell proliferation. We first examined the activity of p38 in response to heregulin in MCF-7 cells by Western analysis of phosphorylated p38. Increasing doses of heregulin provoked a significant augmentation in the content of activated p38 in non transfected MCF-7 as shown in Fig.8A. Similar activation of p38 was also evidenced by transfecting MCF-7 with ErbB2 and ErbB3 receptors. To address whether estrogen-dependent proliferation status of MCF-7 could be modulated by heregulin and to demonstrate whether p38 activity was involved, we measured proliferation of MCF-7 cells by the MTT procedure. As expected for MCF-7 cells, proliferation rates were potently induced over a period of six days in the presence of estradiol (Fig.8B). Starting at day 4 after plating the cells but 24 hours after the initial treatments, addition of heregulin was slowing the estrogen-dependent growth of MCF-7 to become significantly different at day 5 and 6. This delayed proliferation by heregulin was however overcome by addition of the p38 inhibitor, again suggesting that p38 activity is involved in the control of the estrogen-dependent growth by ErbB2/ErbB3 activation. Using the same conditions, we also tested the effects of other kinase inhibitors on estrogen-dependent growth of MCF-7 cells. Inhibition of Erk and Jnk revealed a slight recuperation, although not as significant as with p38 inhibition, in the heregulin mediated inhibition

of cell growth in the presence of estradiol, while cells treated with wortmannin were not proliferating (Fig.8B, right panel).

SRC-1 expression restored the inhibitory effect of ErbB2/ErbB3 activation on estrogen-dependent ER β activity

We showed by using truncated mutants within the AF-1 of ER β that the region between amino acids 104 and 122 was found necessary to mediate the repressive effects of heregulin on ER β activity (Fig.4D). Interestingly, this region contains sequences that correspond to MAPK consensus sites for Ser-106 and Ser-124 that we previously showed to be involved in SRC-1 recruitment upon phosphorylation by MAPK signaling, thereby contributing to activate AF-1 function of ER β (103). Given that this motif seems also to share a repressive role for AF-2 mediated ER β activity, we address the role for specific MAPK consensus sites contained within the aa104-122 region by testing the effects of substituting Ser-106 and Ser-124 by alanine residues in ER β response to ErbB2/ErbB3 signaling. Either single point mutants or the double S106,124A mutant did not show different responses to estradiol in activated ErbB2/ErbB3 expressing cells, as compared to wild type ER β , suggesting that removal of these potential phosphorylation sites did not contribute to modify the repression levels of ER β (Fig. 9A). However, when we substituted Ser-106 and Ser-124 by aspartic acid residues, thus adding a negative charge at these positions, the inhibition in estrogen-dependent ER β activity by heregulin was abolished, indicating that by presumably mimicking phosphorylation at positions 106 and 124, the AF-1

becomes activated thereby relieving its repressive effects to the AF-2 mediated function by heregulin.

Given such role for Ser 106 and 124, we then address the question whether expression of SRC-1 could overcome the inhibition of ER β by ErbB2/ErbB3 activation. As we predict, SRC-1 expression restored the activation levels of ER β by estradiol even in the presence of activated ErbB2/ErbB3 signaling, as shown in cells transfected with increasing amounts of SRC-1 expression vector (Fig.9B). These effects were however restricted to SRC-1 since expression of other members of the SRC family such as GRIP1 and p/CIP could not alleviate the repression of liganded ER β by heregulin. We also obtained no apparent recuperation in ER β response by expressing coactivator CBP. Therefore, our results indicate that SRC-1 was specifically able to block the inhibitory effect of ErbB2/ErbB3 signaling on ER β activity by presumably relieving AF-1 mediated repression.

DISCUSSION

Deregulated signaling by ErbB2 has been associated with strong mitogenic potential in a number of human breast and ovarian cancers, and correlation between ErbB2 and ER α status has served as a predicting factor in the response to endocrine treatment such as tamoxifen (192). The response of ER β to ErbB2 signaling is however less well defined. In the present study, we demonstrate that ER β activity can be modulated by ErbB2 signaling. By using ER-expressing MCF-7 breast cancer cells or ER β -transfected cells, we show that ErbB2/ErbB3 dimer activation by heregulin could repress the ligand-dependent activity of ER β . As opposed to ER α , these effects were dependent upon ER β AF-1 function and involved the p38 MAPK pathway.

Overexpression of ErbB2 is known to reduce the response of ER α to estrogen in ER-positive cells (245,256,270). Similarly, heregulin activation in breast cancer cells also promotes downregulation and inactivation of ER function, leading to a more aggressive phenotype (236,248,249). We show that not only ER α activity was repressed by heregulin, but also the ER β mediated response to ligand was impaired in cells treated with heregulin. In MCF-7 cells stably expressing a luciferase gene reporter under the control of an ERE (266), or in MCF-7 cells overexpressing each isoforms of ER in a one hybrid assay, both ER α and ER β transcriptional activities were altered by heregulin signaling. To further delineate the requirement for ErbB family members in ER repression, we found that the ErbB2/ErbB3 dimer formation in transfected 293 cells could mediate the heregulin induced repression of both ER α

and ER β responses to hormone. Such effects were also reproduced using a constitutive variant of human ErbB2 corresponding to the rat Neu oncogene (271) but not by expression of wt ErbB2 alone, indicating that ErbB2 activated intracellular signaling was involved to modulate ER dependent functions. In a recent study, by causing selective ablation of ErbB3 expression in breast cancer cells, ErbB3 was found essential to promote ErbB2-dependent cell proliferation thus suggesting that the ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit (148). These effects were shown to be transduced by the PI3K/Akt dependent pathway, and despite the recognized impaired tyrosine kinase activity of ErbB3, ErbB3 was described as the preferred dimerization partner of ErbB2 in order to properly recruit the p85 subunit of PI3K and mediate PI3K/Akt activation by ErbB2 (173,213). Furthermore, inactivation of ErbB2 leads to loss of ErbB3 phosphorylation (194). In this study, we demonstrate that expression of both ErbB2 and ErbB3 preferentially modulates the response of ER α and ER β to hormone.

Signaling by ErbB receptor tyrosine kinases are known to trigger a number of intracellular cascade to transduce the effects of growth factors of the EGF family into a cellular response. Particularly, cellular pathways such as the MAPK, the p38 and the PI3K/Akt have been shown to be activated by ErbB signaling and to participate in many aspects in cell cycle regulation including proliferation, transformation, differentiation and apoptosis (116). We have therefore tested various inhibitors of kinases to determine by which pathway the repressive effects of ErbB2/ErbB3 signal on ligand-activated ER functions might be transduced. As there was no doubt about the role for the PI3K/Akt pathway in promoting heregulin-mediated growth of MCF-

7 cells as demonstrated by our proliferation assays and by others (148,213), the effects of heregulin on ER-dependent activity and on estrogen-dependent growth of MCF-7 cells were found to be more dependent on the p38 pathway. In transactivation assays, the inhibition of ER β response to ligand by activated ErbB2/ErbB3 was almost completely relieved by p38 inhibition, while blocking Akt activity did not result in significant changes. Such role for p38 activity in ER β response to heregulin signaling did not seem to occur for ER α for which no apparent effects of p38 inhibition was observed in the heregulin-mediated inhibition of liganded ER α , suggesting a different requirement for p38 activity for each receptors in these conditions. Likewise, when we used the constitutively active MEK6 mutant in an attempt to mimic the heregulin activation of the p38 pathway, the response to estrogen was more impaired for ER β compared to ER α . Interestingly, these effects were restricted to p38 activation while co-expression of active MEK1 with Erk contributed to induce ER-dependent activity in MCF-7 cells. A phosphorylation site within the hormone binding domain of ER α , but that does not seem to be present in ER β , was identified as a target for p38 kinase that might participate in endogenous gene expression and growth of endometrial cancer cells in response to hormone and p38 activation (109). In that respect, our findings on the promoter occupancy of the EB-1 gene, as determined by ChIP assay, also indicate that the p38 pathway might regulate the estrogen-dependent gene expression in ER-expressing cells. However, we found that such regulation variously affect the promoter occupancy by ER α or ER β in heregulin-treated cells. Whether activated p38 by heregulin signaling may affect differently ER homo and/or heterodimer activity cannot be clearly defined and

demands further investigation. However, we previously showed that the AF-1 domain can function in a dominant manner within both the homodimer and the ER α /ER β heterodimer in response to activated MAPK pathway (84). Our results thus suggest a different mechanism by which activation of ErbB2/ErbB3 receptors might influence the hormonal-dependent activity of ER α and ER β .

By using truncated forms for both ER α and ER β in our transfection studies, we have determined that the inhibition of ligand-dependent activity of ER β by activated ErbB2/ErbB3 was dependent upon the presence of the AF-1 containing N-terminal domain, whereas for ER α , no such requirement was evidenced. These results thus suggest that signaling by ErbB2/ErbB3 would target either directly or indirectly ER β AF-1 mediated function, and that such effect would result in a negative modulation of the receptor AF-2 activity. Interestingly, a repressive role of ER β AF-1 was proposed to participate in ER α /ER β heterodimer activity in HepG2 cells in response to ligand (272). By deleting specific regions within ER β AF-1 to better delineate the domain responsible for the repressive effects of heregulin, we found that removal of amino acids 104 to 122 restored a full response of ER β to estrogen in the presence of activated ErbB2/ErbB3. Interestingly, this region was found to contain two consensus motifs previously described to serve as targets for MAPK-directed phosphorylation of ER β (68,103). Both ER α and ER β were shown to be phosphorylated at specific sites within their AF-1 domain upon growth factor stimulation such as EGF and IGF-1, thus promoting both ligand-dependent and independent activation of receptors (68,95,101). Respective phosphorylation of Ser-118 for human ER α , and of Ser-106 and 124 for mouse ER β were shown to favor selective recruitment of coactivators to

mediate activation of transcription (103,273). In the present study, we demonstrate that AF-1 can also mediate repression effects on AF-2 regulated functions of ER β by the aa106-122 region in response to activated ErbB2/ErbB3. Although synergistic regulation and cooperation between AF-1 and AF-2 activities has been evidenced for a number of nuclear receptors, interdomain repression of AF-2 functions by AF-1 has also been reported and shown to be phosphorylation-dependent in some cases. MAPK-directed phosphorylation of a single residue within the AF-1 domain of orphan nuclear receptor SF-1 has been shown to promote in an AF-2 dependent manner cofactor recruitment including corepressor SMRT that repressed SF-1 activity (274). Additionally, the ability of phosphorylated AF-1 domain of PPAR γ by MAPK to negatively regulate the transcriptional and biological functions of PPAR γ in adipogenesis (275,276) was shown to be mediated by reduced ligand binding of PPAR γ (277). Also, phosphorylation of the AF-1 domain of AR (278), RAR γ (279) and RXR α (280) was reported to negatively regulate ligand-dependent functions depending on response gene context. Interestingly, a role for the phosphorylation of specific residues within the AF-1 domains of nuclear receptors have also been ascribed in the functional coupling between receptor degradation and transactivation properties. Phosphorylation of a MAPK consensus site within the AF-1 of PR was shown to increase progestin-dependent activation but also proteasome-mediated receptor degradation (281). Similarly, Akt-mediated phosphorylation of AR was reported to promote receptor ubiquitination and degradation by the proteasome (282). Whether or not such functional coupling between activation and degradation of ER β would be regulated by ErbB2/ErbB3 signaling remains undetermined. Nevertheless,

our results on proteasome-regulated functions of ER β activity indicate that site-specific phosphorylation within the AF-1 may participate in the degradation-activation cycling of the receptor (C. Charbonneau et al. manuscript in preparation).

In order to test whether we could overcome the repression of liganded ER β by heregulin with expression of coactivators, we found that selective expression of SRC-1 restored the inhibition of estrogen-dependent activity of ER β by activated ErbB2/ErbB3, as opposed to other SRC members such as GRIP-1 and p/CIP and to CBP. Interestingly, our earlier findings have demonstrated that recruitment of SRC-1 by phosphorylated AF-1 was preferred to mediate ligand-independent activation of ER β in response to growth factor signaling (103,104). Strikingly, the two sites involved in such recruitment, Ser-106 and 124, are also contained within the region we found essential in the repressive effects of heregulin signaling on ER β activity. These two sites were shown to be targeted by MAPK which upon phosphorylation triggered the receptor to be activated by coactivator recruitment (103). Although Ser-106 and 124 could also be potentially phosphorylated by p38 kinase, it is however unlikely that, in the current study, the phosphorylation of Ser-106 and 124 would mediate the repressive effects of heregulin on ER β activity. Substitutions of both serines by alanine residues in the S106,124A ER β mutant did not produce significant changes on the inhibition of estrogen-dependent response of ER β by activation of ErbB2/ErbB3. On the other hand, in order to attempt mimicking phosphorylation by adding a negative charge at these two positions, we found that the ligand-dependent activity of the S106,124D ER β mutant was not impaired following heregulin

stimulation compared to wt ER β , suggesting that such replacement at positions 106 and 124 may confer AF-1 constitutive activation properties that would overcome the repressive effects of aa106-122 region in response to activation signaling by ErbB2/ErbB3 dimer. Taken together, these findings further support a role for AF-1 in promoting favorable recruitment of coactivators such as SRC-1 to facilitate receptor activity. Such recruitment by the AF-1 region has been reported for both ER α and ER β and shown to promote maximal activation properties (103,235,283,284).

Based on our results demonstrating a role for a discrete region within AF-1 to mediate the repressive effects of ErbB2/ErbB3 signaling on liganded ER β activity but which is apparently not involving direct p38-mediated phosphorylation, at least at positions 106 and 124, we cannot exclude a possible role for heregulin-triggered p38 activation pathway to modulate intrinsic activity of other targets such as nuclear receptor cofactors. In that respect, given the respective response of both receptor AF-1 and AF-2 activity in certain cellular context under normal or pathological conditions, variable uses in the array of transduction signals to target other components involved in receptor coregulation are likely to occur. Accordingly, the coactivation properties of SRC-1 and CBP were found to be enhanced upon kinase-directed phosphorylation (96,285). MAPK-mediated phosphorylation of AIB1/SRC-3 was shown to stimulate the interaction with p300, thus resulting in enhanced ER-mediated transcription (286). Activation of ER β by Brx, a proto-oncogene that functions as a Rho-guanine exchange factor, was reported to be dependent upon phosphorylation of ER β and possible associated factors by p38 kinase (110). Kinase transduction pathways were also shown to regulate corepressor recruitment to nuclear

receptors. Tyrosine kinase signaling was reported to negatively regulates SMRT-TR interaction (287) whereas increased recruitment of SMRT was favored by phosphorylated PPAR γ (288). Direct phosphorylation of SMRT by MEKK1 was also proposed to modulate its subcellular distribution and receptor recruitment (289).

We thus believe that such recruitment of a putative corepressor to ER β AF-1 by a p38 dependent manner may contribute to the inhibition of the liganded receptor in response to activation of ErbB2/ErbB3 dimer. Such recruitment would therefore impede the AF-1 function to fully participate in the hormonal response of ER β . Either expression of SRC-1 or constitutive activation of AF-1 by aspartic residues replacement at positions 106 and 124 would relieve such repression by restoring adequate AF-1 activity to ER β . Although a similar inhibition by heregulin signaling was also observed for liganded ER α , our data does not support a common mechanism responsible for the repression of both ER α and ER β mediated response to estrogen. In that respect, the metastatic-associated protein MTA-1, whose expression correlates well with the metastatic potential of several human cancers including breast cancer, was found to behave as a potent repressor of ER α function in response to activation of ErbB2 signaling (60). MTA-1 was also found to recruit HDAC isoforms in response to heregulin to mediate ER α transcriptional repression. Whether or not MTA-1 could also function as an ER β repressor is not known, but MTA-1 was found to interact with the ligand binding domain of ER α for its repressive effects (60).

In summary, we have thus identified a region within the N-terminal region of ER β that might promote AF-1 mediated repression of the hormonal response of ER β . This

apparent interdomain relationship between AF-1 and AF-2 functions would be involved to mediate the repressive effects of activated ErbB2/ErbB3 receptor dimer on hormonal dependent ER β activity and cell proliferation through p38 dependent activation. This mechanism of ER β repression is not shared by ER α which outlined the differential requirement and activity of the AF-1 region for both estrogen receptors.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Antibodies to ER α (H184), ER β (H150), ErbB2 (C18), ErbB3 (C17), and phosphotyrosine (PY20) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-p38 and anti-phospho-p38 were purchased from Cell signaling (Beverley, MA). Secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies were obtained from BioSource International (Camarillo, CA), and protein A/G-PLUS agarose from Santa Cruz Biotechnology.

Recombinant human growth factors HRG α and HRG were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN), and EGF from Roche Biochemicals (Laval, QC). 17 β -estradiol (E2) was obtained from Sigma (St-Louis, MO). SB203580 and AG1478 inhibitors are from Calbiochem (San Diego, CA), PD98059 and SP600125 from BioMol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA), and Wortmannin from Sigma.

Plasmids

Expression pCMX plasmids coding for mouse ER α , mouse ER β , and related mutants were described previously (103,104). The constitutively active V659E and the kinase deficient K753A forms of human ErbB2 were generated by PCR mutagenesis from pSV2-ErbB2 (290) and the wt and mutated forms subcloned into pCMX. The mutations were confirmed by automated sequencing. pcDNA-derived plasmids for human ErbB1/EGFR (291) and ErbB3 (292) were described.

Cell culture, transfection and luciferase assay

MCF-7 and 293T cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) supplemented with antibiotics and respectively 10% and 5% fetal bovine serum, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The stable transfectant MCF-7 cells expressing a luciferase reporter gene under the control of an ERE (266) were grown in the same conditions as the parental MCF-7 cells. For transient transfection, cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextran-treated serum and plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method. Typically, for luciferase assay, cells were seeded into 24-well plates and transfected when indicated with 500ng reporter construct, 50-100ng ER expression plasmid, 100ng each of ErbB receptor, kinase and/or coactivator expression plasmids, and 500ng pCMX- β in a total of 2 μ g DNA. After 5-8 h, medium was changed and cells were treated with 10nM E2 and/or 50ng/ml growth factors unless otherwise stated, for 16-20 h. Cells were then harvested in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100 and lysates analysed for luciferase activity using a luminometer (Wallac). Luciferase values were normalized for transfection efficiency to β -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared to controls. luciferase assays are usually performed in duplicates repeated at least three times.

Cell lysates, immunoprecipitation and immunoblotting

For the determination of phosphorylated ErbB receptors, cells were seeded in 100 mm dishes, washed twice with PBS and serum starved for approximately 5 hours. Cells were then treated with heregulin for 10 minutes when indicated, washed twice with ice cold PBS and lysed in RIPA buffer consisting of 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate acid, 0.1% SDS, 1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 1mM PMSF, and 1 pellet of protease inhibitor cocktail (Roche) in PBS. Cell lysates were then collected, clarified by centrifugation, and incubated with 1-2 μ g of the appropriate anti-ErbB overnight at 4C with gentle agitation. Immune complexes were recovered with protein A/G-PLUS agarose, washed three times in lysis buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose and immunoblotting was performed. Briefly, membranes were blocked at 4C with blocking reagent (Roche) in TBS, probed with anti-phosphotyrosine antibody, and signals revealed by ECL using a HRP-conjuguated secondary antibody. Total amounts of ErbB receptors were determined by immunoblot using the appropriate anti-ErbB antibodies on immunoprecipitates. For the determination of phosphorylated and total p38, whole cell extracts were prepared and analysed by immunoblot as described above.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were performed essentially as described (58) with minor modifications. MCF-7 cells were grown to 90% confluence and serum starved for 16h. Following

treatment with E2 and/or HRG β for 30 minutes, cells were washed and cross-linked with 1% formaldehyde for 10min at room temperature, rinsed twice in ice cold PBS containing protease inhibitors (Roche) and harvested by centrifugation. Cells were lysed in SDS lysis buffer (50mM Tris pH 8.0 containing 10 mM EDTA and 1% SDS) for 10 minutes on ice, sonicated 6 times for 10s, and lysates were clarified by centrifugation at 13K for 10min. Supernatants of sonicated lysates were diluted tenfold with ChIP dilution buffer (16.7mM Tris pH 7.5 containing 167mM NaCl, 1.2mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS and protease inhibitor cocktail), and 5% of the chromatin solution was kept aside for input DNA before immunoprecipitation. Samples were pre-cleared with 2 μ g salmon sperm DNA and protein A/G-PLUS agarose beads for 30 minutes at 4°C with gentle agitation. Immunoprecipitation was performed with 5 μ g of anti-ER α or anti-ER β at 4C overnight followed by addition of salmon sperm DNA-protein A/G agarose slurry for 1h at 4C with rotation. Beads were collected by centrifugation at 3K for 5min, and the immune complexes were washed sequentially for 5min each with low salt wash buffer (20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), high salt wash buffer (same as low salt wash buffer except with 500mM NaCl), LiCl wash buffer (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1% deoxycholate acid, 1% Nonidet P-40, 0.25M LiCl) and TE buffer (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA). The antibody-bound chromatin was eluted twice with 250 μ l of elution buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO₃) for 15 minutes at room temperature, and formaldehyde crosslink was reversed by addition of 0.2M NaCl and heated to 65C for 4h. Samples were digested with 50 μ g/ml proteinase K in 40mM Tris pH 6.5 and 10mM EDTA at 45C for 1hr

prior to DNA extraction by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. For PCR, 2-5µl of DNA sample were used and PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis and visualised with ethidium bromide.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was determined by using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl] tetrazolium bromide (MTT) assay. MCF-7 cells were seeded at low density in phenol red free DMEM supplemented with dextran charcoal-treated serum in 48-well plates. Treatments with hormone, heregulin and/or inhibitors were started at day 3 and added in fresh medium every subsequent days. For growth measurements, 0.5mg/ml MTT was added to cells for 2-4 h at 37C, followed by extraction with 0.04M HCl in 2-propanol to dissolve the formazan crystals, and reading by spectrophotometry at 570 nM. All samples were assayed in triplicate from 3-4 independent experiments.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Decrease of the ER-dependent response to estrogen by growth factor heregulins. **A-** Stable transfectants of MCF-7 cells expressing an EREtkLuc reporter gene were treated with vehicle or 10nM 17 β -estradiol (E2) and 50ng/mL of EGF, heregulin α (HRG α), or heregulin β (HRG β) as indicated for 16hrs. Results are expressed as fold response of luciferase activity values normalized to β -galactosidase activity, compared to control set at 1.0. **B-** Transcriptional response to estrogen in stably transfected MCF-7 cells with an EREtkLuc reporter treated with increasing amounts of heregulin β . Concentrations are in ng/mL for HRG and 10nM for E2. Values are expressed as in A. **C-** Stable MCF-7 transfectants were transfected with expression plasmids encoding ER α or ER β and treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β as indicated. Values are expressed as in (A).

Figure 2. ErbB2 receptor dimers regulate the response to estrogen. **A-** 293T cells were transiently transfected with an ER β plasmid in the presence of EREtkLuc reporter and expression constructs encoding ErbB1/EGFR, ErbB2/HER-2, and ErbB3 receptors. Cells were then treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β for 16hrs and harvested for luciferase activity. Results are expressed as fold activation compared to cells treated with vehicle alone. **B-** Whole cell lysates of 293T cells transiently expressing ErbB2, ErbB3, and/or ErbB2 V659E mutant and treated with vehicle or 50ng/ml HRG β for 10min, were immunoprecipitated with an anti-ErbB2 antibody and immunoprecipitates subjected to Western analysis using an anti-phosphotyrosine

antibody. Expression of ErbB2 protein was monitored by Western analysis on whole cell extracts of transfected cells. **C-** Similar experiments as in B except that an anti-ErbB3 antibody was used for immunoprecipitation and Western analysis. Cells were also transfected with the K753A kinase dead mutant form of ErbB2. **D-** Effects of expression of a constitutively active (V659E) or a kinase dead (K753A) form of ErbB2 in absence or presence of ErbB3 on E2-dependent activity of ER β in 293T cells transfected with ERE-tkLuc reporter.

Figure 3. Expression of ErbB2 V659E mutant alters the ER-dependent activity to estrogen in MCF-7. **A-** EREtkLuc-expressing stable transfectants of MCF-7 cells were transfected with the constitutively active form of ErbB2 (V659E) and treated with 10nM E2 prior to luciferase activity measurement. Results are expressed as fold activity compared to untreated mock transfected stable MCF-7 cells set arbitrarily at 1.0. **B-** MCF-7 cells were transiently transfected with Gal4 fusions of ER α or ER β in the presence of a UAStkLuc reporter and with or without the ErbB2 constitutively active V659E mutant. Cells were then treated with vehicle or 10nM E2 and harvested for luciferase assay. **C-** MCF-7 cells were transfected with plasmids for ER α or ER β , and treated with 10nM E2 and the indicated amounts of HRG (ng/ml) prior to luciferase activity measurement. **D-** Cellular extracts of MCF-7 or MCF-7 transiently expressing ErbB2 or ErbB2 V659E receptors were immunoprecipitated with either an anti-ErbB2 or an anti-ErbB3 antibody. Immunoprecipitates were analysed by Western blot using an anti-phospho-tyrosine antibody. Lysates were also monitored for ErbB2

and ErbB3 expression by Western analysis. Where indicated, cells were treated with 50ng/ml HRG β for 10min.

Figure 4. ErbB-mediated decrease of estrogen response by ER β is AF-1 dependent. **A-** 293 cells were transiently transfected with expression vectors for full length ER α or ER β , or their respective truncated forms missing the AF-1 region (CDEF mutants) in the presence of the EREtkLuc reporter. Cells were then treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β for 16hrs and harvested for luciferase assay. Results are expressed as % change of the E2 response set at 100%. **B-** 293 cells were transfected as above except that a UASTkLuc reporter and plasmids encoding Gal4 fusions of wt and CDEF forms of ER α and ER β were used. When indicated, cells were also transfected with an ErbB2 V659E expression plasmid. Cells were treated with 10nM E2 for 16hrs. Result are expressed as in (A). **C-** 293 cells were transiently transfected with EREtkLuc reporter and ER β or CDEF β in the presence of wt, V659E, or K753A forms of ErbB2, and ErbB3 as indicated. Cells were treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β for 16hrs. **D-** N-terminal truncated forms of ER β were transiently expressed in 293 cells with ErbB2 and ErbB3 receptors, and their transcriptional activity determined following treatment with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β . Numbers identifying the deleted constructs refer to the amino acid position of ER β . Results are compared to cells treated with E2 alone which was set at 100%.

Figure 5. The effect of heregulin to decrease the estrogen response by ER β involves p38 activation. **A-** 293 cells were transiently transfected with EREtkLuc reporter and expression vectors for ER β and ErbB2/ErbB3 receptors. After transfection, cells were treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β and the following inhibitors: Wortmannin (200 nM; W), SP600125 (1 mM ; SP), PD98059 (50 mM ; PD), SB203580 (10 mM ; SB) and AG1478 (1 mM ; AG). **B-** EREtkLuc stably expressing MCF-7 cells were mock transfected or transfected with the ErbB2 V659E mutant in absence or presence of increasing amounts of expression plasmid for kinase dead mutant of MEK6 (K82R). After transfection, cells were treated with vehicle, 10nM E2 and 10 mM p38 inhibitor SB203580 as indicated. **C-** 293 cells were transfected as in (A) except that an expression plasmid for ER α was used. **D-** Similar to (C), except that an expression vector for CDEF α was used.

Figure 6. Activation of the p38 pathway contributes to decrease the estrogen response of ER β . **A-** MCF-7 stable cells for EREtkLuc were transfected with expression vectors for constitutive mutants of MEK1 or MEK6 with or without plasmids coding for Erk, Jnk or p38 MAP kinases. Cells were then treated with vehicle or 10nM E2 for 16hrs and harvested for luciferase assay. **B-** 293 cells were transfected with EREtkLuc reporter and expression vectors for ER β , and for MEK constitutive mutants and MAPKs as in (A). After transfection, cells were treated with 10nM E2. **C-** Similar as (B) except that an expression vector for ER α was used. **D-** Western analysis of activated p38. 293 cells were transiently transfected with expression plasmids for ErbB2, ErbB2 constitutive V659E mutant, ErbB3,

constitutive MEK6glu mutant and/or MEK6 K82R kinase dead mutant. After transfection, cells were treated with 50ng/ml HRG β for 10min and lysed for Western analysis using an anti-phospho-p38 antibody. Whole cell lysates were also analysed for p38 content using an anti-p38 antibody.

Figure 7. Promoter occupancy by ER α and ER β is regulated by heregulin.

Soluble chromatin was prepared from MCF-7 cells treated with E2 and/or 50 ng/ml HRG β for 45min and immunoprecipitated with antibodies against ER α or ER β . When indicated, cells were also treated with 50mM PD98059 (PD) or 10mM SB203580 (SB). DNA was then extracted and amplified using primers that cover the promoter region of EB1 that contains the estrogen response element (ERE). The input represents amplified signals for each conditions before immunoprecipitation.

Figure 8. Heregulin-mediated decrease in estrogen-induced cell proliferation is p38 dependent. A- Western analysis for activated p38 upon heregulin treatment in MCF-7 cells. MCF-7 or MCF-7 transfected with plasmids for ErbB2 and ErbB3 were treated with HRG β for 10min and harvested for Western analysis using an anti phospho-p38 antibody. Whole cell lysates were also analysed for p38 content using an anti-p38 antibody. **B-** MTT proliferation assay on MCF-7 cells treated with 10nM E2, 50ng/mL HRG β , and/or 5mM of the MAP kinase p38 inhibitor SB203580. Cells were treated every day and harvested for MTT reduction colorimetric assay. Results are expressed as % change from untreated cells set at 100%, and represent mean values of triplicate measurements from 3-4 independent experiments.

Figure 9. The decrease in estrogen-dependent ER β activity by heregulin is restored by SRC-1 expression. **A-** 293T cells were transfected with EREtkLuc reporter and wtER β , or mutated S106,124A (AA) or S106,124D (DD) ER β , in the presence of ErbB2 and ErbB3 receptors. Cells were treated with 10nM E2 and 50ng/ml HRG β and harvested for luciferase activity. **B-** 293T cells were transfected with EREtkLuc reporter and ER β plasmids in the presence or absence of ErbB2 and ErbB3. Increasing amounts (ng/well) of SRC coactivators and CBP were added to transfections as indicated. Cells were then treated with E2 and HRG β as in A. Results are compared to untreated cells for each conditions.

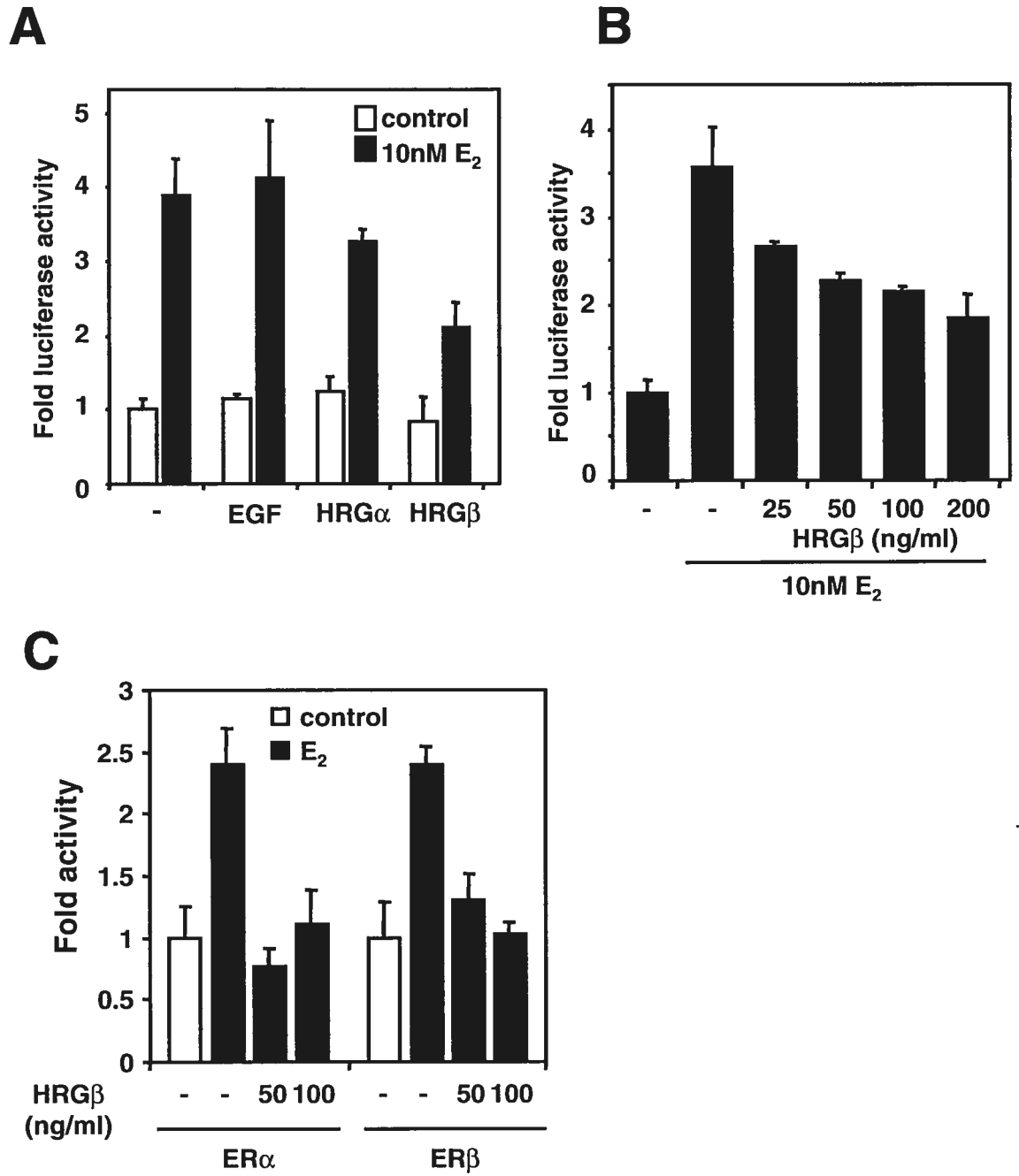
Fig.1

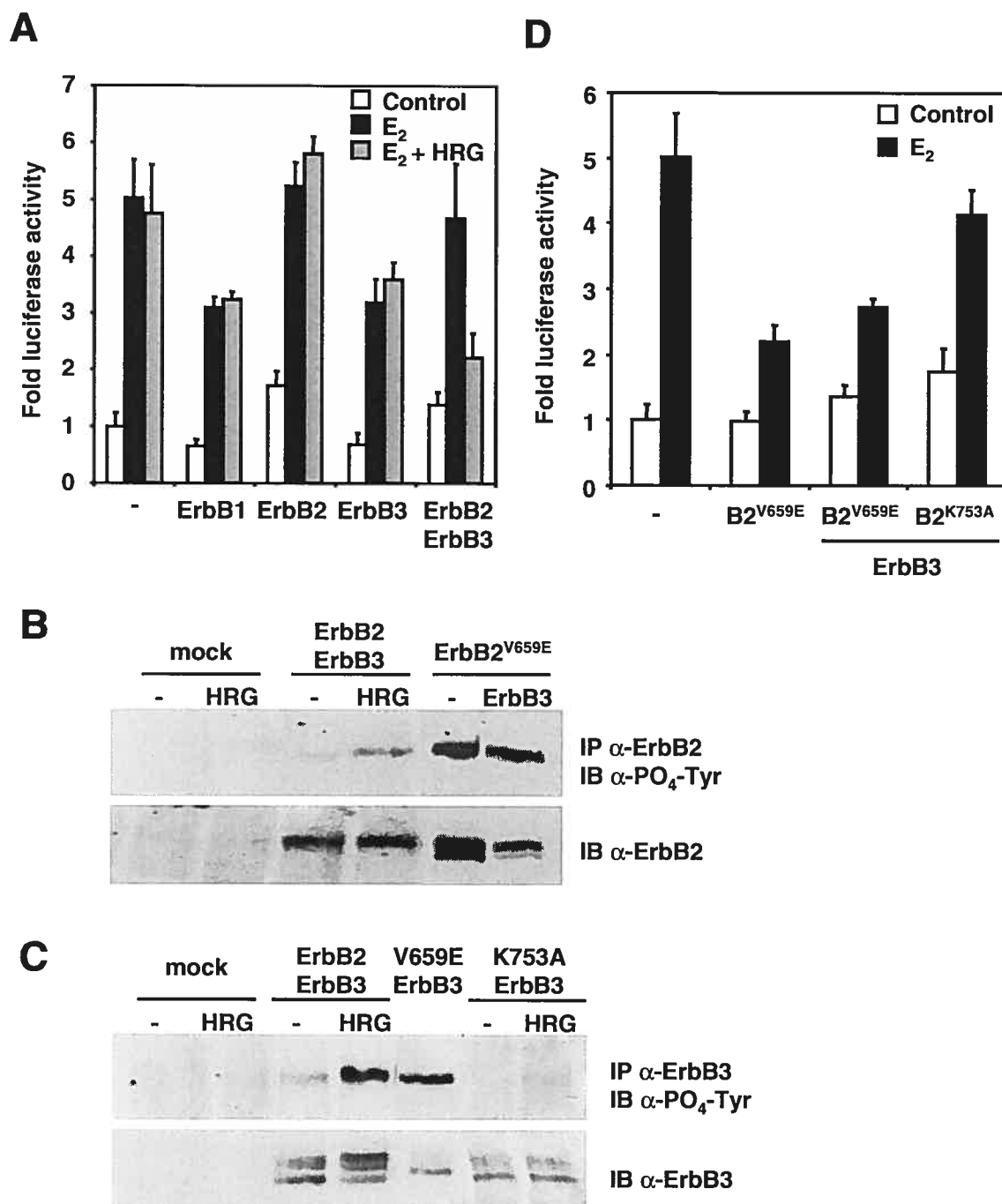
Fig.2

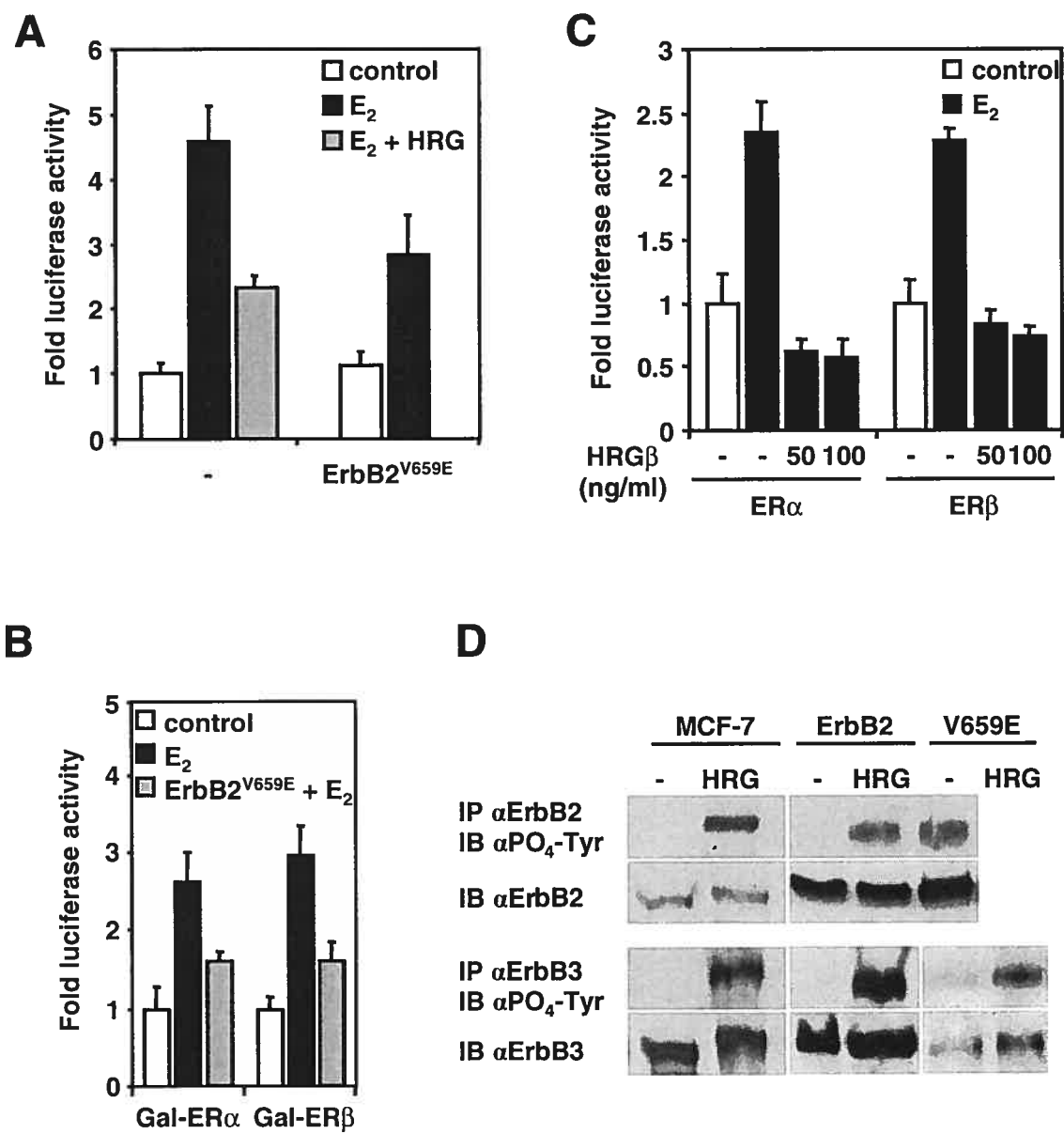
Fig.3

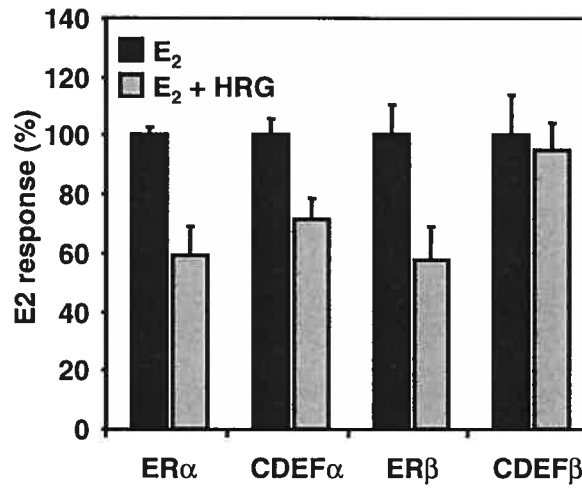
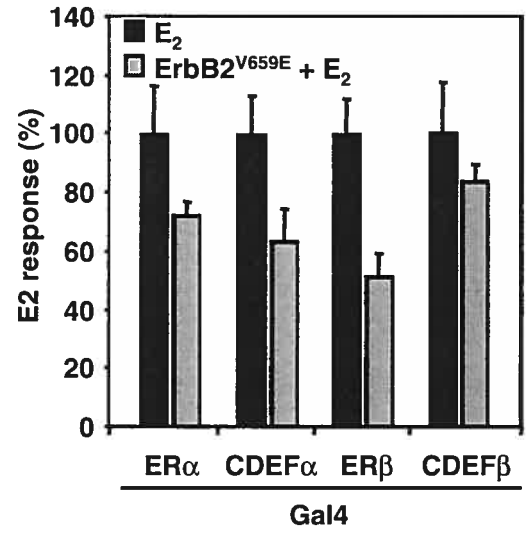
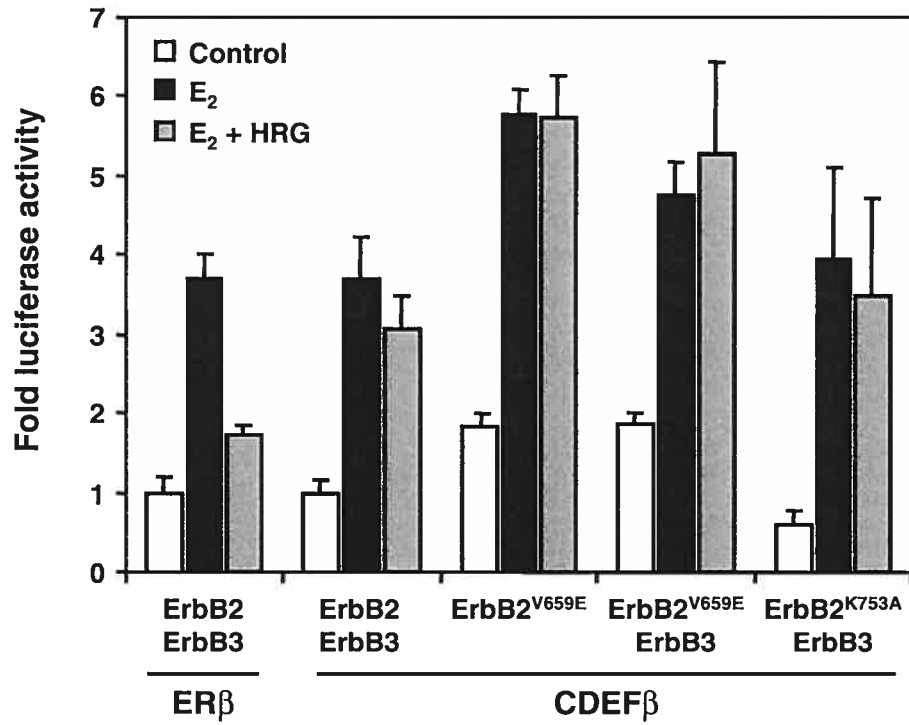
Fig. 4**A****B****C**

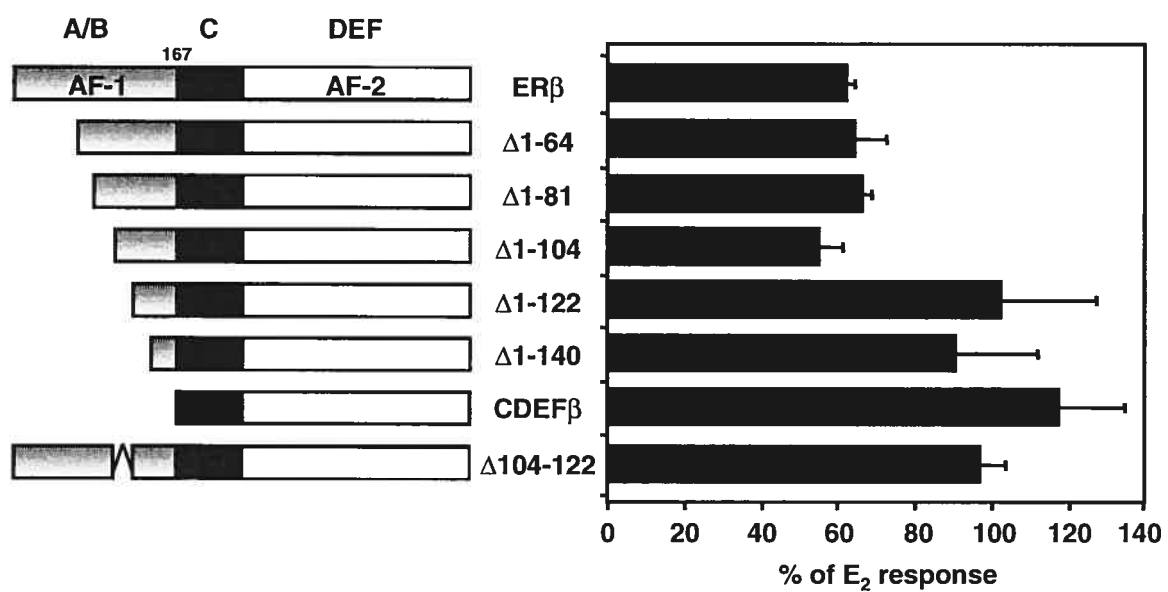
Fig. 4**D**

Fig.5

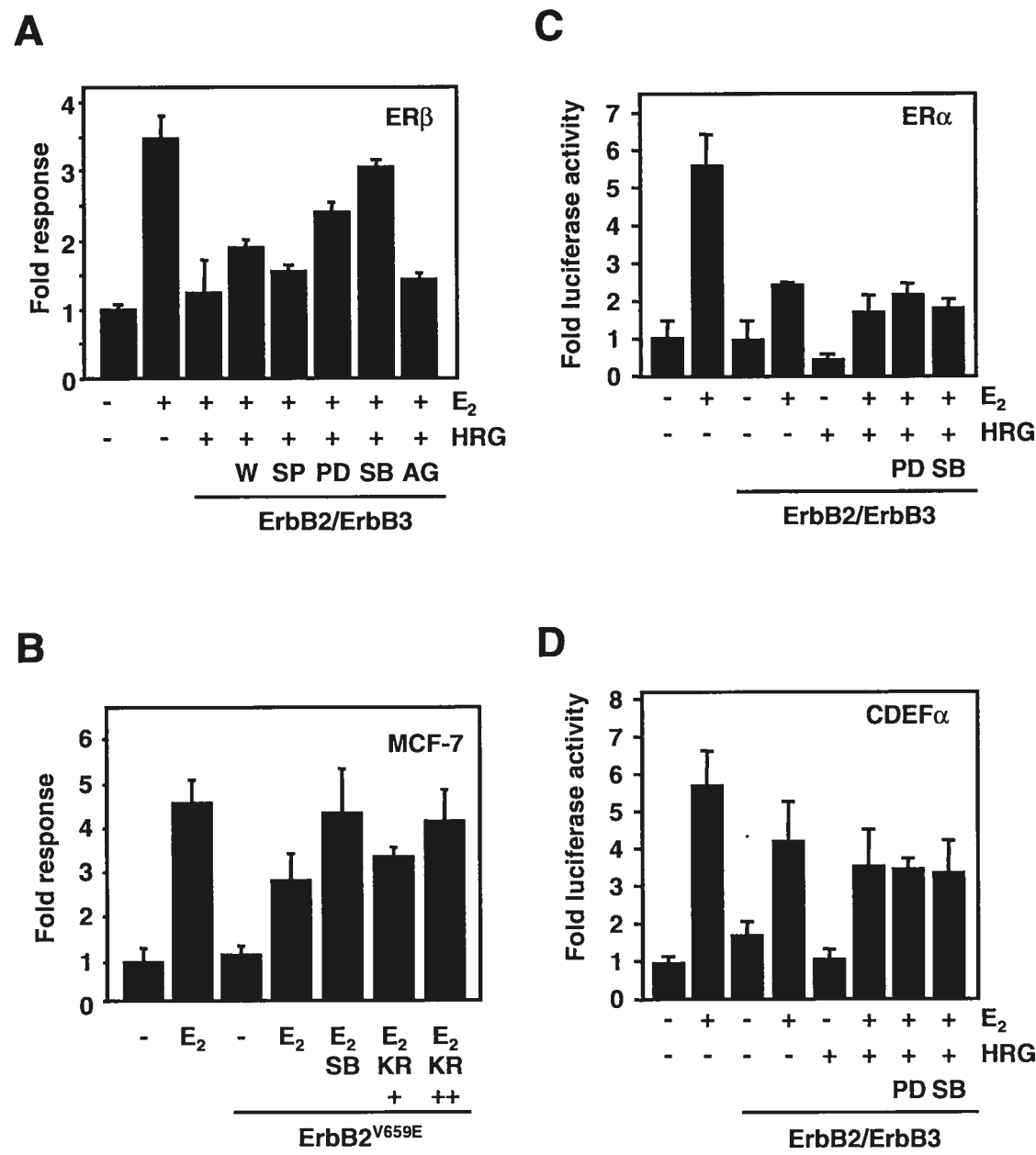


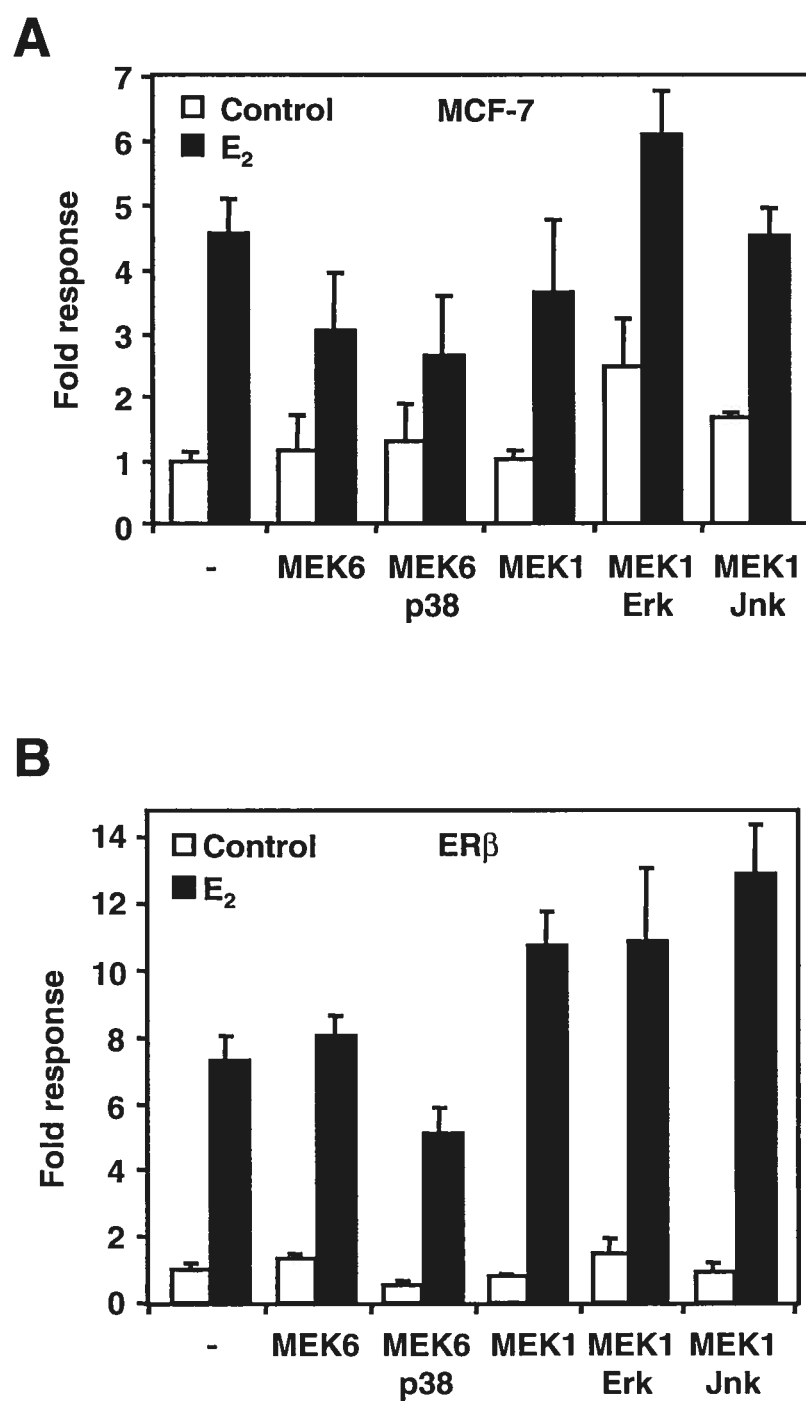
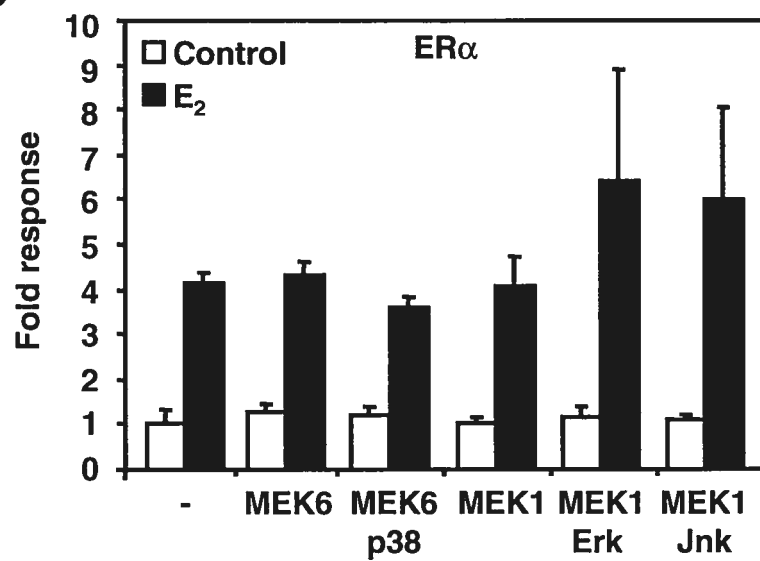
Fig.6

Fig.6

C



D

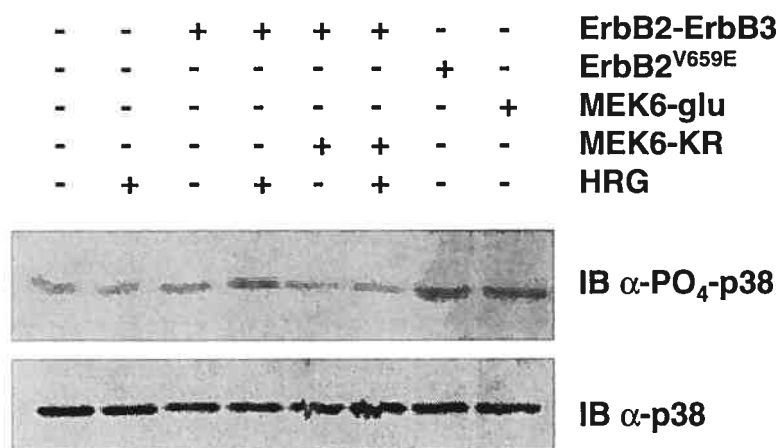


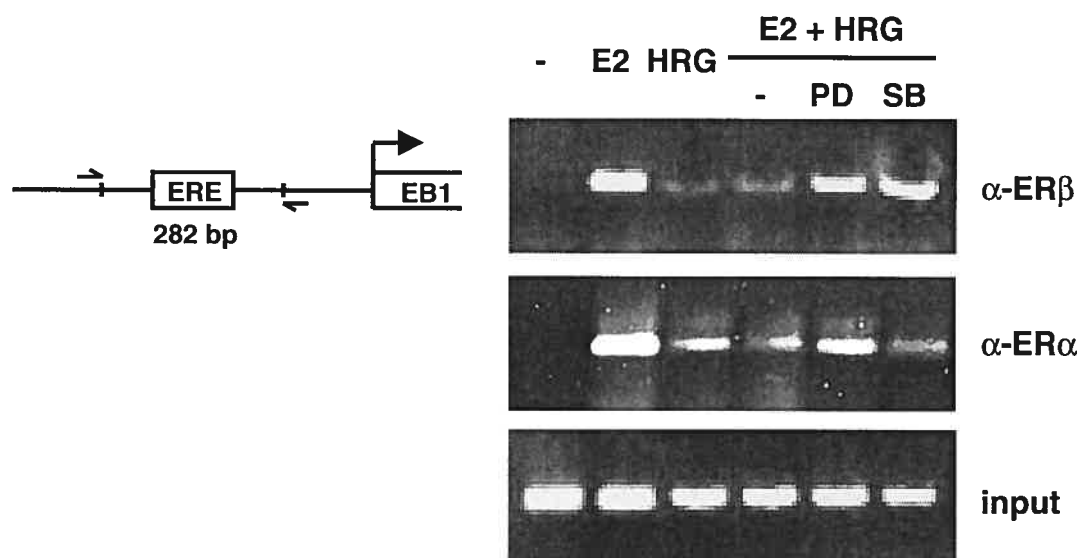
Fig.7

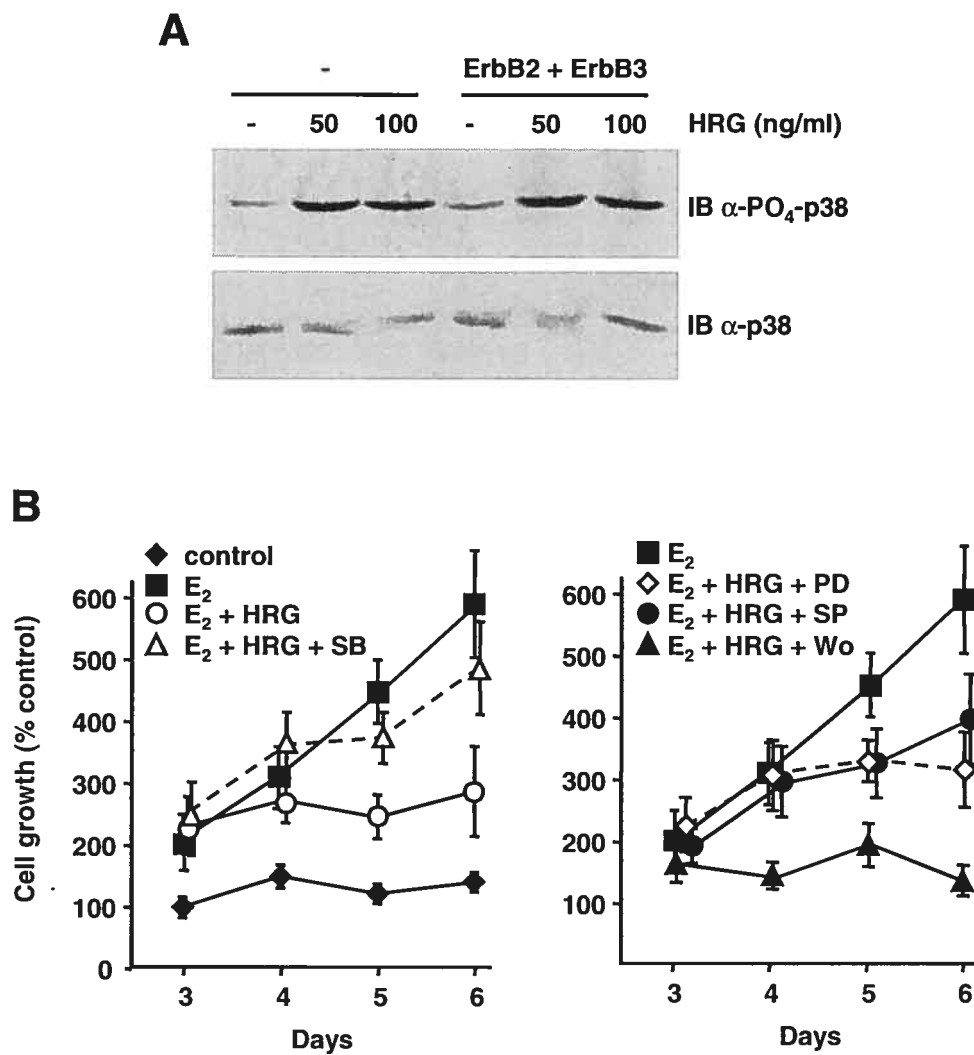
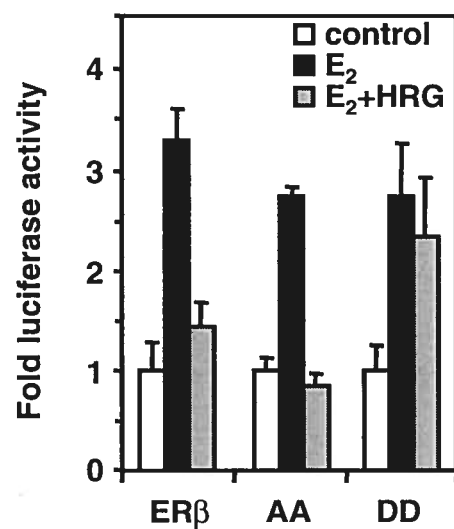
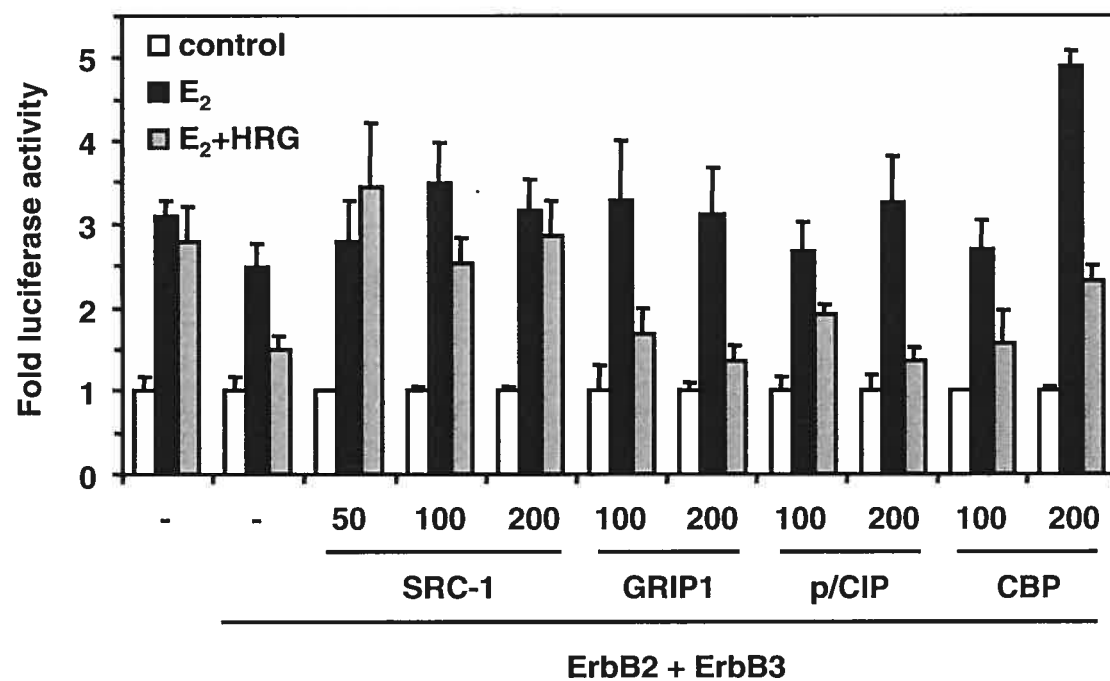
Fig.8

Fig.9**A****B**

Acknowledgments

We wish to thank M.C. Hung and Y. Yarden for the generous gifts of ErbB plasmids. MEK and MAPK plasmids were kindly provided by S. Gutkind and R. Davis. We are grateful to E. Badia for the stable MCF-7 cell line. V. St-L. and C.C. hold an award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. André Tremblay is a New Investigator of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by the CIHR, the Cancer Research Society, and the Canadian Foundation for Innovation.

REFERENCES

1. **Adams, M., M. J. Reginato, D. Shao, M. A. Lazar, and V. K. Chatterjee.** 1997. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen- activated protein kinase site. *Journal of Biological Chemistry* **272**:5128-5132.
2. **Ali, S. and R. C. Coombes.** 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat.Rev.Cancer* **2**:101-112.
3. **Atlas, E., M. Cardillo, I. Mehmi, H. Zahedkargaran, C. Tang, and R. Lupu.** 2003. Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol.Cancer Res.* **1**:165-175.
4. **Badia, E., M. J. Duchesne, S. Fournier-Bidoz, A. E. Simar-Blanchet, B. Terouanne, J. C. Nicolas, and M. Pons.** 1994. Hydroxytamoxifen induces a rapid and irreversible inactivation of an estrogenic response in an MCF-7-derived cell line. *Cancer Res.* **54**:5860-5866.
5. **Bastien, J., S. Adam-Stitah, T. Riedl, J. M. Egly, P. Chambon, and C. Rochette-Egly.** 2000. TFIID interacts with the Retinoic Acid Receptor γ (RAR γ) and phosphorylates its AF-1 Activating domain through cdk7. *J Biol Chem.*
6. **Benz, C. C., G. K. Scott, J. C. Sarup, R. M. Johnson, D. Tripathy, E. Coronado, H. M. Shepard, and C. K. Osborne.** 1993. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res.Treat.* **24**:85-95.
7. **Brunner, N., B. Boysen, S. Jirus, T. C. Skaar, C. Holsthansen, J. Lippman, T. Frandsen, M. Spangthomsen, S. A. W. Fuqua, and R. Clarke.** 1997. Mcf7/Lcc9 - an Antiestrogen-Resistant Mcf-7 Variant In Which Acquired Resistance to the Steroidal Antiestrogen ICI 182,780 Confers an Early Cross-Resistance to the Nonsteroidal Antiestrogen Tamoxifen. *Cancer Research* **57**:3486-3493.
8. **Bunone, G., P.-A. Briand, R. J. Miksicek, and D. Picard.** 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *European Molecular Biology Organization Journal* **15**:2174-2183.
9. **Burstein, H. J., L. N. Harris, P. K. Marcom, R. Lambert-Falls, K. Havlin, B. Overmoyer, R. J. Friedlander, Jr., J. Gargiulo, R. Strenger, C. L. Vogel, P. D. Ryan, M. J. Ellis, R. A. Nunes, C. A. Bunnell, S. M. Campos,**

- M. Hallor, R. Gelman, and E. P. Winer.** 2003. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J.Clin.Oncol.* **21**:2889-2895.
10. **Camp, H. S. and S. R. Tafuri.** 1997. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **272**:10811-10816.
 11. **Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali, and H. Nakshatri.** 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α : a new model for anti-estrogen resistance. *J.Biol.Chem.* **276**:9817-9824.
 12. **Coutts, A. S. and L. C. Murphy.** 1998. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen- nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res.* **58**:4071-4074.
 13. **Cowley, S. M., S. Hoare, S. Mosselman, and M. G. Parker.** 1997. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry* **272**:19858-19862.
 14. **Dowsett, M., C. Harper-Wynne, I. Boeddinghaus, J. Salter, M. Hills, M. Dixon, S. Ebbs, G. Gui, N. Sacks, and I. Smith.** 2001. HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res.* **61**:8452-8458.
 15. **Driggers, P. H., J. H. Segars, and D. M. Rubino.** 2001. The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J.Biol.Chem.* **276**:46792-46797.
 16. **Dutertre, M. and C. L. Smith.** 2003. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol.Endocrinol.* **17**:1296-1314.
 17. **Endoh, H., K. Maruyama, Y. Masuhiro, Y. Kobayashi, M. Goto, H. Tai, J. Yanagisawa, D. Metzger, S. Hashimoto, and S. Kato.** 1999. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol.Cell Biol.* **19**:5363-5372.
 18. **Enslen, H., J. Raingeaud, and R. J. Davis.** 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J.Biol.Chem.* **273**:1741-1748.

19. **Fiddes, R. J., P. W. Janes, S. P. Sivertsen, R. L. Sutherland, E. A. Musgrove, and R. J. Daly.** 1998. Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cells. *Oncogene* **16**:2803-2813.
20. **Font de Mora, J. and M. Brown.** 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol.Cell Biol* **20**:5041-5047.
21. **Giguère, V., A. Tremblay, and G. B. Tremblay.** 1998. Estrogen receptor β : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* **63**:335-339.
22. **Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld.** 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**:121-141.
23. **Goodman, R. H. and S. Smolik.** 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**:1553-1577.
24. **Hall, J. M. and D. P. McDonnell.** 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140**:5566-5578.
25. **Hammer, G. D., I. Krylova, Y. Zhang, B. D. Darimont, K. Simpson, N. L. Weigel, and H. A. Ingraham.** 1999. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol.Cell* **3**:521-526.
26. **Harari, D. and Y. Yarden.** 2000. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* **19**:6102-6114.
27. **Hellyer, N. J., M. S. Kim, and J. G. Koland.** 2001. Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor. *J.Biol.Chem.* **276**:42153-42161.
28. **Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbas, III, and N. E. Hynes.** 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:8933-8938.
29. **Holbro, T., G. Civenni, and N. E. Hynes.** 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp.Cell Res.* **284**:99-110.
30. **Hong, S. H. and M. L. Privalsky.** 2000. The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol.Cell Biol.* **20**:6612-6625.

31. **Hong, S.-H., C.-H. Wong, and M. L. Privalsky.** 1998. Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone recetor) corepressor. *Molecular Endocrinology* **12**:1161-1171.
32. **Howell, A., D. J. DeFriend, J. Robertson, R. Blamey, and P. Walton.** 1995. Response to a specific antiestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* **345**:29-30.
33. **Ignar-Trowbridge, D. M., C. T. Teng, K. A. Ross, M. G. Parker, K. S. Korach, and J. A. McLachlan.** 1993. Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Molecular Endocrinology* **7**:992-998.
34. **Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger, and P. Chambon.** 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**:1491-1494.
35. **Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, H. E. Jones, T. Madden, J. M. Gee, M. E. Harper, D. Barrow, A. E. Wakeling, and R. I. Nicholson.** 2003. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* **144**:1032-1044.
36. **Kurokawa, H., A. E. Lenferink, J. F. Simpson, P. I. Pisacane, M. X. Sliwkowski, J. T. Forbes, and C. L. Arteaga.** 2000. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**:5887-5894.
37. **Lavinsky, R. M., K. Jepsen, T. Heinzel, J. Torchia, T. M. Mullen, R. Schiff, A. L. Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gemsch, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, and D. W. Rose.** 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N- CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:2920-2925.
38. **Lee, A. V., J. G. Jackson, J. L. Gooch, S. G. Hilsenbeck, E. Coronado-Heinsohn, C. K. Osborne, and D. Yee.** 1999. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol.Endocrinol.* **13**:787-796.
39. **Lee, H. and W. Bai.** 2002. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol.Cell Biol.* **22**:5835-5845.

40. **Lee, H. Y., Y. Suh, M. J. Robinson, J. L. Clifford, W. K. Hong, J. R. Woodgett, M. H. Cobb, D. J. Mangelsdorf, and J. M. Kurie.** 2000. Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J.Biol.Chem.*
41. **Leitzel, K., Y. Teramoto, K. Konrad, V. M. Chinchilli, G. Volas, H. Grossberg, H. Harvey, L. Demers, and A. Lipton.** 1995. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J.Clin.Oncol.* **13**:1129-1135.
42. **Lin, H. K., L. Wang, Y. C. Hu, S. Altuwaijri, and C. Chang.** 2002. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* **21**:4037-4048.
43. **Lin, H. K., S. Yeh, H. Y. Kang, and C. Chang.** 2001. Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:7200-7205.
44. **Lin, S. Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon, and M. C. Hung.** 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat.Cell Biol.* **3**:802-808.
45. **Liu, Y., D. El Ashry, D. Chen, I. Y. Ding, and F. G. Kern.** 1995. MCF-7 breast cancer cells overexpressing transfected c-erbB-2 have an in vitro growth advantage in estrogen-depleted conditions and reduced estrogen-dependence and tamoxifen-sensitivity in vivo. *Breast Cancer Res.Treat.* **34**:97-117.
46. **Lupu, R., M. Cardillo, C. Cho, L. Harris, M. Hijazi, C. Perez, K. Rosenberg, D. Yang, and C. Tang.** 1996. The significance of heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. *Breast Cancer Research & Treatment* **38**:57-66.
47. **Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans.** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.
48. **Mazumdar, A., R. A. Wang, S. K. Mishra, L. Adam, R. Bagheri-Yarmand, M. Mandal, R. K. Vadlamudi, and R. Kumar.** 2001. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat.Cell Biol.* **3**:30-37.
49. **McKenna, N. J. and B. W. O'Malley.** 2002. Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. *Endocrinology* **143**:2461-2465.
50. **Neve, R. M., T. Holbro, and N. E. Hynes.** 2002. Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK

in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* **21**:4567-4576.

51. **Neve, R. M., H. Sutterluty, N. Pullen, H. A. Lane, J. M. Daly, W. Krek, and N. E. Hynes.** 2000. Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* **19**:1647-1656.
52. **Olayioye, M. A., R. M. Neve, H. A. Lane, and N. E. Hynes.** 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**:3159-3167.
53. **Oñate, S. A., V. Boonyaratankornkit, T. E. Spencer, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, D. P. Edwards, and B. W. O'Malley.** 1998. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *Journal of Biological Chemistry* **273**:12101-12108.
54. **Palmieri, C., G. J. Cheng, S. Saji, M. Zelada-Hedman, A. Warri, Z. Weihua, S. Van Noorden, T. Wahlstrom, R. C. Coombes, M. Warner, and J. A. Gustafsson.** 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* **9**:1-13.
55. **Pettersson, K., K. Grandien, G. G. J. M. Kuiper, and J.-Å. Gustafsson.** 1997. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology* **11**:1486-1496.
56. **Pietras, R. J., J. Arboleda, D. M. Reese, N. Wongvipat, M. D. Pegram, L. Ramos, C. M. Gorman, M. G. Parker, M. X. Sliwkowski, and D. J. Slamon.** 1995. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* **10**:2435-2446.
57. **Pinkas-Kramarski, R., M. Shelly, B. C. Guarino, L. M. Wang, L. Lyass, I. Alroy, M. Alimandi, A. Kuo, J. D. Moyer, S. Lavi, M. Eisenstein, B. J. Ratzkin, R. Seger, S. S. Bacus, J. H. Pierce, G. C. Andrews, Y. Yarden, and M. Alimandi.** 1998. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network [published errata appear in *Mol Cell Biol* 1998 Dec;18(12):7602 and 1999 Dec;19(12):8695]. *Mol.Cell Biol.* **18**:6090-6101.
58. **Rowan, B. G., N. Garrison, N. L. Weigel, and B. W. O'Malley.** 2000. 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol.Cell Biol.* **20**:8720-8730.

59. **Shang, Y., X. Hu, J. DiRenzo, M. A. Lazar, and M. Brown.** 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**:843-852.
60. **Shao, D., S. M. Rangwala, S. T. Bailey, S. L. Krakow, M. J. Reginato, and M. A. Lazar.** 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature (London)* **396**:377-380.
61. **Shawver, L. K., D. Slamon, and A. Ullrich.** 2002. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* **1**:117-123.
62. **Shen, T., K. B. Horwitz, and C. A. Lange.** 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell Biol.* **21**:6122-6131.
63. **Sweeney, C. and K. L. Carraway, III.** 2000. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* **19**:5568-5573.
64. **Sweeney, C., D. Fambrough, C. Huard, A. J. Diamonti, E. S. Lander, L. C. Cantley, and K. L. Carraway, III.** 2001. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J. Biol. Chem.* **276**:22685-22698.
65. **Tang, C. K., C. Perez, T. Grunt, C. Waibel, C. Cho, and R. Lupu.** 1996. Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone-independent phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res.* **56**:3350-3358.
66. **Tremblay, A. and V. Giguere.** 2001. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **77**:19-27.
67. **Tremblay, A., G. B. Tremblay, F. Labrie, and V. Giguere.** 1999. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* **3**:513-519.
68. **Tremblay, G. B., A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, F. Labrie, and V. Giguère.** 1997. Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Molecular Endocrinology* **11**:353-365.
69. **Tremblay, G. B., A. Tremblay, F. Labrie, and V. Giguère.** 1999. Dominant Activity of Activation Function 1 (AF-1) and Differential Stoichiometric Requirements for AF-1 and -2 in the Estrogen Receptor α - β Heterodimeric Complex. *Molecular and Cellular Biology* **19**:1919-1927.

70. **Watanabe, T., S. Inoue, H. Hiroi, A. Orimo, H. Kawashima, and M. Muramatsu.** 1998. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Molecular & Cellular Biology* **18**:442-449.
71. **Webb, P., P. Nguyen, J. Shinsako, C. Anderson, W. Feng, M. P. Nguyen, D. Chen, S.-M. Huang, S. Subramanian, E. M. McInerney, B. S. Katzenellenbogen, M. R. Stallcup, and P. J. Kushner.** 1998. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Molecular Endocrinology* **12**:1605-1618.
72. **Weigel, N. L. and Y. Zhang.** 1998. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of Molecular Medicine* **76**:469-479.
73. **Weiner, D. B., J. Liu, J. A. Cohen, W. V. Williams, and M. I. Greene.** 1989. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* **339**:230-231.
74. **Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**:127-137.
75. **Yu, D. and M. C. Hung.** 2000. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* **19**:6115-6121.
76. **Zhou, B. P., M. C. Hu, S. A. Miller, Z. Yu, W. Xia, S. Y. Lin, and M. C. Hung.** 2000. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- kappaB pathway. *J.Biol.Chem.* **275**:8027-8031.

C. État de publication du manuscrit

L'article St-Laurent, V., Sanchez, M., Charbonneau, C. et Tremblay, A. *The Hormone-Dependent Activity of Estrogen Receptor Beta is Altered by a p38-Dependent ErbB2/ErbB3 Signaling to the AF-1 Domain* sera soumis à la revue *Molecular Endocrinology* au cours de l'été 2004.

IV. DISCUSSION

L'article présenté porte principalement sur l'effet de la signalisation des récepteurs ErbB2 et ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle de ER β . Les résultats obtenus sont résumés et font l'objet d'une discussion dans la présente section.

Une résistance aux hormones stéroïdiennes, dont les estrogènes, accompagne fréquemment la surexpression de récepteurs de facteurs de croissance après les premiers stades de progression tumorale de la glande mammaire (60). Plusieurs évidences indiquent que la signalisation des estrogènes influence celle de l'héréguline (HRG) et du dimère ErbB2/ErbB3 et vice versa. Cette influence réciproque aurait un effet sur l'indépendance hormonale de certains types de cancer du sein (60). Étant donné que les effets de la signalisation des ErbB sur la réponse aux estrogènes de ER β sont moins caractérisés que sur celle de ER α et que plusieurs différences entre les deux isoformes de récepteurs ont été rapportées, le but principal du projet de recherche est d'étudier l'effet de la signalisation du dimère ErbB2/ErbB3 sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des estrogènes β . Dans notre étude, nous avons montré que, comme pour ER α , l'activité de ER β peut être modulée par la signalisation de ErbB2. Nous démontrons également que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'HRG diminue la réponse aux estrogènes de ER β et que cet effet implique un rôle pour le domaine d'activation AF-1 de ER β . La région de ER β qui est requise pour observer les effets de l'HRG est aussi requise pour le recrutement du coactivateur SRC-1. Toutefois, les effets de l'HRG sur l'activité ligand-dépendante de ER α ne requiert pas le domaine AF-1. De plus, l'effet inhibiteur de la réponse ligand-dépendante de ER β exercée par l'HRG dépend de l'activation de la voie de la MAP kinase p38.

Dans un premier temps, nos résultats montrent que contrairement au facteur de croissance EGF, les facteurs de croissance HRG α et HRG β entraînent une diminution de l'activité transcriptionnelle estrogène-dépendante dans les cellules

MCF-7, une lignée cellulaire cancéreuse mammaire qui exprime ErbB2, ErbB3, ER α et ER β (Figure 1A). L'HRG β provoque une diminution plus accrue que l'HRG α (Figure 1A) en plus d'exercer un effet similaire sur l'activité transcriptionnelle estrogène-dépendante de ER α et aussi de ER β (Figure 1C). Ces résultats supportent les observations rapportées par d'autres équipes selon lesquelles l'HRG provoque une altération de l'activité transcriptionnelle de ER dans les cellules MCF-7 (60,236). De plus, il est attendu que la baisse sur la réponse aux estrogènes causée par l'HRG β soit plus forte que celle engendrée par HRG α étant donné que les isoformes β de l'HRG auraient une meilleure affinité pour leur récepteur ErbB3 (293,294). D'autre part, l'activation ligand-indépendante des ER suite à l'action de certains facteurs de croissance, dont fait partie l'EGF, ainsi que l'augmentation de la réponse aux estrogènes des ER en présence d'EGF est bien documentée (95,101,103,104). Par conséquent, il aurait pu être attendu que l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante et ligand-indépendante des ER en présence d'EGF soit plus grande que celle observée à la figure 1A. Cependant, une étude a déjà rapporté une activation minime de la transcription ERE-dépendante suite à un traitement à l'EGF dans des cellules COS-7 transfectées avec ErbB1 et ER α (295). Une autre étude montre une absence d'activation H-Ras-dépendante de la transcription ERE-dépendante suite à un traitement à l'EGF dans des cellules MCF-7 (296,297). Probablement que l'amplitude de l'effet d'EGF sur l'activité transcriptionnelle ERE-dépendante est un phénomène dont la variabilité est influencée par le type cellulaire et les conditions expérimentales.

Le dimère ErbB2/ErbB3 est requis pour la manifestation de l'effet de l'HRG β sur la réponse aux estrogènes de ER β dans les cellules 293T transfectées transitoirement (Figure 2A). Ces cellules n'expriment pas sinon très peu de récepteurs ErbB de façon endogène (Figure 2B et 2C). Tout comme l'activation de ErbB2/ErbB3, le mutant constitutif ErbB2 V659E provoque une baisse de l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de ER β (Figure 2D). Le variant ErbB2 V659E est la forme humaine mutée homologue à celle identifiée chez le rat où une valine en position 664 est remplacée par un acide glutamique. ErbB2 atteint de cette mutation

devient une variante oncogénique chez le rat et cela permet une dimérisation et une activation constitutive du récepteur (191). Il est intéressant de noter que selon nos résultats la surexpression de ErbB2 n'est pas suffisante pour provoquer une baisse de la transcription ERE-dépendante en présence d'estrogènes. D'après nos observations, ErbB2 doit être activé soit par la dimérisation avec ErbB3 en présence d'HRG ou encore par une mutation constitutive pour que l'effet sur la réponse aux estrogènes se manifeste. Mazumdar *et al.* montrent également une baisse de l'activité ligand-dépendante dans des cellules transfectées avec un mutant constitutif de ErbB2 (60). Il a été rapporté que la surexpression de ErbB2 provoque une activation de son domaine kinase de façon ligand-indépendante par la formation spontanée de dimère (173). Cependant, nos résultats suggèrent que l'effet de la surexpression de ErbB2 sur la signalisation des estrogènes est probablement causé par la coopération de ErbB2 avec d'autres partenaires ErbB comme ErbB3. Dans ce sens, la surexpression de ErbB2 dans plusieurs cancers est souvent accompagnée de l'expression de ErbB3 (298,299).

L'utilisation d'un système de gène rapporteur répondant au ER fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et dans un modèle cellulaire physiologique représenté par les cellules MCF-7 (Figure 3B) permet d'appuyer les résultats obtenus dans les cellules 293T transfectées à la figure 2D. Le système de gène rapporteur Gal4 utilise une construction plasmidique du domaine de liaison à l'ADN du facteur de levure Gal4 fusionnée au récepteur des estrogènes ainsi qu'un gène rapporteur contenant les éléments de réponse à Gal4. ER α et ER β réagissent de façon similaire au traitement à l'HRG ainsi qu'à l'expression du mutant constitutif ErbB2 V659E dans les cellules MCF-7 (Figure 1C , 3B et 3C). L'effet inhibiteur de ErbB2 activé sur la réponse estrogène-dépendante des deux isoformes de ER est ainsi démontré avec deux systèmes de gène rapporteur soient le système de gène rapporteur Gal4 et le système de gène rapporteur ERE-Tkluc dans les cellules MCF-7 (Figure 3A et 3B).

L'HRG β provoque la phosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs ErbB2 et ErbB3 tout comme le mutant constitutif de ErbB2 dans les cellules 293T

transfectées transitoirement (Figure 2B et 2C). Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il a été montré que l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 est activé par l'HRG (153,154,201). Cependant, une légère diminution de la phosphorylation de ErbB2 et de ErbB3 (en comparaison avec le niveau d'activation de ErbB3 suite à l'action de HRG) est observée lorsque ErbB2 V659E et ErbB3 sont cotransfectés dans les cellules 293T. La présence de ErbB3 semble altérer la formation de l'homodimère V659E résultant en une diminution de l'activation de ErbB2 mais aussi une augmentation de ErbB3 activé de façon ligand-indépendante. Le mutant ErbB2 K753A ne possède pas de domaine kinase actif alors il ne peut activer ErbB3 en présence d'HRG comme le montre la figure 2C. Étant donné que ErbB3 ne possède pas de domaine kinase intrinsèque, il nécessite un partenaire de dimérisation pour être phosphorylé et acquérir un potentiel de signalisation (300). Une autre étude va dans le sens de nos observations car elle montre qu'une inactivation de ErbB2 entraîne une baisse de phosphorylation des résidus tyrosine de ErbB3 (194). Dans les cellules MCF-7, l'expression de ErbB2 V659E n'entraîne pas un niveau d'activation de ErbB2 beaucoup plus élevé que lorsque ces cellules sont traitées avec de l'HRG (Figure 3D). Les cellules 293T cotransfectées avec ErbB2/ErbB3 et traitées avec de l'HRG montrent quant à elles un niveau d'activation de ErbB2 plus faible que lorsqu'elles sont transfectées avec le mutant constitutif ErbB2 V659E (Figure 2B). Ces observations suggèrent que le mutant constitutif de ErbB2 entre en compétition avec les autres récepteurs ErbB dans les cellules MCF-7 qui expriment ErbB2 et ErbB3 de façon endogène contrairement aux cellules 293T transfectées transitoirement. En effet, il est probable que le mutant ErbB2 V659E puisse se dimériser avec plus de récepteurs ErbB dans les cellules MCF-7 que dans les cellules 293T transfectées. Toutefois, le faible niveau d'activité de ErbB3 dans les cellules MCF-7 qui expriment le mutant constitutif ErbB2 V659E (Figure 3D) suggère que celui-ci préfère d'autres partenaires de dimérisation que ErbB3 soit probablement ErbB2.

ER α et ER β réagissent de façon similaire au niveau de la réponse aux estrogènes suite à une stimulation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'HRG ou par un

mutant ErbB2 constitutif. Cependant, les régions impliquées dans cet effet ne semblent pas être les mêmes pour les deux isoformes de récepteurs des estrogènes. Le domaine d'activation AF-1 situé dans la portion N-terminale de ER β est essentiel pour l'observation des effets d'un ErbB2 activé sur la réponse aux estrogènes (Figure 4C). Plus précisément, la portion de l'AF-1 de ER β qui est responsable de l'effet de ErbB2 activé sur la réponse aux estrogènes est localisée entre les résidus 104 et 122 (Figure 4D). L'AF-1 de ER α ne semble pas être impliqué dans cet effet (Figure 4A et 4B). Une récente étude montre que suite à un traitement à l'HRG, il y a une hausse de l'expression d'un corépresseur appelé MTA1 (60). Au cours de cette même étude, il a été suggéré que l'HRG promouvait l'association entre le corépresseur et ER α et qu'il y a ensuite recrutement de HDAC afin de compromettre l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il a été montré que cette interaction entre ER α et le corépresseur MTA1 ne nécessite pas l'AF-1 de ER α (60). Les résultats que nous avons obtenus selon lesquels contrairement à l'AF-2, l'AF-1 de ER α n'est pas essentiel pour observer l'effet de l'HRG sur la réponse aux estrogènes, concordent avec les observations réalisées par cette autre étude.

Étant donné la faible homologie de séquence au niveau de l'AF-1 des deux isoformes de ER, il apparaît probable que cette différence soit à l'origine de plusieurs divergences dans le fonctionnement moléculaire de ER α et ER β . Par exemple, le recrutement des coactivateurs peut se faire différemment selon l'isoforme du récepteur des estrogènes (86,103,104). La phosphorylation des résidus sérines 106 et 124 de ER β suite à l'activation de la voie des MAP kinases permet un recrutement des coactivateurs SRC-1 et CBP à l'AF-1 de façon ligand-indépendante (103,104). Par ailleurs, la région comprise entre les résidus 104 et 122 de ER β , qui contient les sites consensus de phosphorylation par les MAP kinases (68,103) et dont la phosphorylation favorise le recrutement des coactivateurs à l'AF-1 de ER β (103,104), a été identifiée comme étant essentielle à l'effet de l'HRG sur l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de ER β . Ainsi, nos observations suggèrent que l'AF-1 possède également une capacité de répression de l'AF-2. La signalisation de

l'HRG par l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 ciblerait directement ou indirectement l'AF-1 de ER β et pourrait ainsi jouer un rôle au niveau du recrutement de coactivateurs à l'AF-1 de ER β . Ainsi, nos résultats suggèrent qu'une même région de l'AF-1 peut moduler l'activité transcriptionnelle de ER β différemment selon le type de ligand apparenté à l'EGF qui est utilisé.

L'utilisation de divers inhibiteurs synthétiques et de plasmides d'expression de mutants dominants négatifs a permis de constater que l'activation de la voie de la MAP kinase p38 est impliquée dans la répression de l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante manifestée par l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 chez ER β (Figures 5A et 5B). La voie des MAP kinases p42/p44 semble également jouer un rôle dans l'effet inhibiteur de l'HRG mais dans une moindre mesure que celle de la MAP kinase p38 (Figure 5A). L'inhibition p38-dépendante de la réponse aux estrogènes de ER β est aussi présente dans les cellules MCF-7 qui coexpriment les deux types de récepteurs (Figure 5B) mais n'est toutefois pas observable pour ER α dans les cellules 293T transfectées (Figure 5C). Les travaux de Mazumdar *et al.* portant sur l'effet modulateur de l'HRG sur l'activité transcriptionnelle de ER α ne traitent pas des voies de signalisation impliquées dans cet effet inhibiteur de l'HRG (60). Ainsi, selon nos résultats, les effets inhibiteurs provoqués par l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 observés sur ER α ne seraient pas médiés par l'activation HRG-dépendante des voies des MAP kinases p42/44 et p38.

Une activation accrue de la voie de la MAP kinase p38, causée par l'utilisation d'un mutant constitutif de MEK6 dont le rôle est d'activer p38, entraîne une légère baisse de l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante dans les cellules MCF-7 (Figure 6A). L'activation des voies des MAP kinases p42/p44 (Erk1/2) et JNK provoque plutôt une hausse de l'activité transcriptionnelle générale des récepteurs des estrogènes chez ces mêmes cellules. Il est en effet connu que l'activation de la voie des MAP kinases p42/p44 augmentent l'activité transcriptionnelle des récepteur des estrogènes (95,101,104). Selon nos résultats, l'activation de la MAP kinase p38 cause une diminution de l'activité

transcriptionnelle de ER β mais pas de ER α (Figure 6B et 6C). Une étude réalisée par Driggers *et al.* montre que l'activation de la MAP kinase p38 par un mutant constitutif de MEK6 entraîne une augmentation de la transcription ligand-dépendante de ER β , ce qui va à l'encontre de ce que nous avons observé. Cependant, cette activation est observée dans un contexte cellulaire différent de ceux que nous avons utilisé soit dans les cellules utérines Ishikawa transfectées transitoirement (110). Par ailleurs, une récente étude montre une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER α par l'activation de la voie MEKK1/p38 dans des cellules d'adénocarcinomes endométriaux (109). Étant donné que nos observations ne montrent aucun effet de l'activation de la MAP kinase p38 sur l'activité de ER α , il est possible que l'activation de la MAP kinase p38 par différentes kinases, en l'occurrence MEK6 ou MEKK1, provoque des effets variables sur l'activité des ER. Le contexte cellulaire dans lequel les effets de l'activation de la voie de la MAP kinase p38 sur l'activité des ER sont étudiés pourrait également présenter certaines différences au niveau des résultats et des interprétations qui en découlent.

D'après nos résultats d'essais d'immunoprécipitation de la chromatine, l'HRG entraîne une diminution de l'occupation au promoteur d'un gène cible des récepteurs des estrogènes, EB1 (269), par ER α et ER β et ce, en présence d'estrogènes (Figure 7). L'HRG permet aussi le recrutement de ER α et de ER β au promoteur du gène *eb1* ce qui suggère que l'HRG pourrait réguler l'activité ligand-indépendante des ER. La présence de l'inhibiteur de MAP kinase p42/p44 PD98059 fait remonter la liaison des deux types de récepteurs au promoteur (Figure 7). Cette dernière observation concorde avec les résultats des essais d'activité transcriptionnelle où la réponse aux estrogènes en présence d'HRG est relevée légèrement par l'inhibiteur de MAP kinases p42/p44 chez ER β (Figure 5A). La remontée occasionnée par le traitement PD98059 sur l'activité ligand-dépendante de ER α en présence d'HRG observée à la figure 7 n'a pas été observée dans les essais d'activité transcriptionnelle (Figure 5C). Le rôle des MAP kinases p42/p44 dans l'effet HRG-dépendant sur l'activité de ER α reste à être caractérisé. Contrairement à ER α , l'inhibiteur de la MAP kinase p38,

SB203580, fait augmenter l'occupation du promoteur du gène *eb1* par ER β en présence d'estrogènes et d'HRG par rapport au traitement d'estrogènes et d'HRG seuls. Ces observations concordent avec les résultats d'essais d'activité transcriptionnelle obtenus aux figures 5A et 5C dans le sens où l'effet de l'HRG fait diminuer l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de ER β selon un mécanisme impliquant la MAP kinase p38. L'inhibition p38-dépendante de l'activité des récepteurs des estrogènes ne serait pas utilisé pour ER α .

Une étude réalisée sur les cellules T47D, une autre lignée cancéreuse mammaire, a montré une activation de la MAP kinase p38 suite à un traitement avec de l'HRG (262). Nos résultats montrent également une activation de la voie de la MAP kinase p38 dans les cellules MCF-7 suite à un traitement à l'HRG (Figure 8A). Comme l'HRG fait diminuer l'activité ERE-dépendante en présence d'estrogène dans les essais d'activité transcriptionnelle, nous avons voulu évaluer l'impact de l'HRG sur la prolifération cellulaire estrogène-dépendante des MCF-7. Nous avons observé que l'HRG fait diminuer la prolifération estrogène-dépendante des cellules MCF-7 (Figure 8B). Ainsi, nos résultats des essais de prolifération concordent avec les résultats des essais de gène rapporteur et aussi avec ceux d'une autre étude où l'auteur avait évalué l'impact de l'HRG sur la prolifération estrogène-dépendante de plusieurs lignées cancéreuses du sein (301). L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des voies des MAP kinase p42/p44, JNK et p38 ainsi que de la voie PI3-kinase dans nos essais de prolifération montrent que l'HRG diminuerait la prolifération estrogène-dépendante des cellules MCF-7 selon un mécanisme principalement p38-dépendant. Il a déjà été proposé que la voie PI3-kinase est essentielle à la prolifération des cellules cancéreuses mammaires exprimant le dimère ErbB2/ErbB3 (148) et nous observons également une absence de prolifération chez les cellules traitées avec la wortmannin, un inhibiteur de la voie PI3-kinase (Figure 8B). Étant donné que les cellules MCF-7 coexpriment les deux isoformes de ER, il devient plus complexe de déterminer si cet effet inhibiteur de l'HRG sur la prolifération estrogène-dépendante est un effet manifesté par ER α ou ER β . Nos résultats d'essais transcriptionnels et d'essais d'immunoprécipitation de la chromatine semblent indiquer qu'il s'agit d'un

effet réalisé principalement par ER β étant donné que l'activation de la MAP kinase p38 n'a aucune incidence sur l'activité transcriptionnelle de ER α (Figure 5C et 6C) et que l'inhibiteur de la MAP kinase p38 ne module pas l'occupation du promoteur du gène *eb1* par ER α en présence d'estrogène et d'HRG (Figure 7). Ces observations supportent l'idée que l'effet inhibiteur p38-dépendant de l'HRG sur la prolifération cellulaire estrogène-dépendante des cellules MCF-7 serait manifesté par ER β et non par ER α .

Nos résultats ont montré que l'effet de l'activation ErbB2/ErbB3 sur l'activité ligand-dépendante de ER β requiert la région comprise entre les résidus 104 et 122 (Figure 4D). Cette région contient les sites consensus de phosphorylation par les MAP kinases soient les résidus sérines 106 et 124 qui, une fois phosphorylés permettent le recrutement du coactivateur SRC-1 (103). La mutation de ces deux résidus sérines qui les rend impossible à phosphoryler n'a pas d'effet sur l'inhibition HRG-dépendante de l'activité transcriptionnelle de ER β (Figure 9A). Cependant, si les sérines 106 et 124 sont remplacées par des résidus d'acide aspartique, c'est-à-dire qu'une charge négative leur est attribuée de sorte qu'ils imitent une phosphorylation, l'effet inhibiteur de l'HRG sur l'activité ligand-dépendante est relevée (Figure 9A). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des sérines 106 et 124 provoque l'activation de l'AF-1 et par le fait même empêche l'effet répressif exercé par l'HRG. De plus, la surexpression de SRC-1, et non celle de p/CIP, GRIP et de CBP, permet aussi de relever l'inhibition estrogène-dépendante manifesté présumément par l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 (Figure 9B). Ces observations semblent indiquer que SRC-1 est capable de bloquer l'effet répressif de l'HRG probablement en relevant une répression exercée sur l'AF-1.

Dans notre étude, nous démontrons que l'effet répressif de l'HRG nécessite l'activation de la voie de la MAP kinase p38. Il est probable que les résidus sérines 106 et 124 soient phosphorylables par la MAP kinase p38 mais nos résultats semblent indiquer que ce n'est pas une phosphorylation directe de ces résidus sur ER β qui est à l'origine de la répression de l'AF-2 suite à l'activation du dimère ErbB2/ErbB3.

Premièrement, lorsque ces sites sont mutés de sorte qu'ils ne puissent pas être phosphorylés, l'effet répressif de l'HRG a toujours lieu. Deuxièmement, lorsqu'une mutation des résidus 106 et 124 imitent une phosphorylation, l'effet inhibiteur de l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 n'est pas accentué mais plutôt aboli. Ainsi, l'activation constitutive de l'AF-1 contreviendrait aux effets répressifs de l'HRG, probablement en favorisant le recrutement de coactivateurs tels que SRC-1. Si la MAP kinase p38 activée ne semble pas cibler ER β directement pour manifester son effet inhibiteur sur la transcription ligand-dépendante, il est possible qu'elle régule l'activité des cofacteurs associés aux ER. Dans la poursuite du projet, il serait intéressant de déterminer si l'activation de la MAP kinase p38 module l'activité des coactivateurs et/ou des corépresseurs associés aux ER et aussi d'étudier l'interaction entre les corégulateurs et ER β dans ce contexte.

D'après l'ensemble de nos résultats, nous proposons que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'HRG qui entraîne l'activation de la voie de la MAP kinase p38 favorise le recrutement d'un corépresseur à l'AF-1 de ER β . Cette corépression empêcherait l'AF-1 de participer pleinement à la réponse estrogène-dépendante de ER β . Ainsi, un tel corépresseur serait également recruté aux fusions de ER β et de Gal4 empêchant la liaison de ceux-ci à leur élément de réponse. Cependant, le recrutement de coactivateurs par la surexpression d'un coactivateur tel que SRC-1 ou par l'activation constitutive de l'AF-1 permettrait de libérer ER β du corépresseur. La nature d'un tel corépresseur reste inconnue pour le moment. Le mécanisme qui régit la répression ERE-dépendante de ER α par l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 serait différent de celui utilisé pour ER β . Par ailleurs, il a déjà été rapporté que le corépresseur MTA1 est surexprimé en réponse à l'HRG dans les cellules MCF-7 et qu'il interagit avec le domaine de liaison au ligand de ER α afin d'inhiber son activité transcriptionnelle (60).

En conclusion, nous avons déterminé que l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 par l'HRG diminue l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante des deux isoformes de ER. Cependant, l'activité de ER α et ER β serait modulée de façon différente dans

un tel contexte. En effet, contrairement à ER α , l'inhibition de l'activité transcriptionnelle estrogène-dépendante de ER β par l'HRG requiert le domaine d'activation AF-1 et l'activation de la voie de la MAP kinase p38. L'étude de l'activation du dimère ErbB2/ErbB3 sur l'activité de ER β dresse un tableau plus complet de la régulation transcriptionnelle des ER dans ce contexte en plus de soulever des mécanismes de régulation différentiels au niveau du fonctionnement moléculaire des deux isoformes de ER. Ainsi, nous croyons que nos travaux contribuent à une meilleure compréhension de l'intégration des signaux hormonaux impliqués dans les phénomènes de prolifération et de différenciation des tissus gynécologiques.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. Zhang P, Rodriguez H, Mellon SH 1995 Transcriptional regulation of P450scc gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. *Mol Endocrinol* 9:1571-1582
2. Lauber M, Muller J 1989 Purification and characterization of two distinct forms of rat adrenal cytochrome P450(11) beta: functional and structural aspects. *Arch Biochem Biophys* 274:109-119
3. Staels B, Hum DW, Miller WL 1993 Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 7:423-433
4. Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER 1987 Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450, adrenodoxin, and low density lipoprotein receptor in bovine follicles and corpora lutea throughout the ovarian cycle. *Mol Endocrinol* 1:274-279
5. Auchus RJ, Miller WL 1999 Molecular modeling of human P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol Endocrinol* 13:1169-1182
6. Sherbet DP, Tiosano D, Kwist KM, Hochberg Z, Auchus RJ 2003 CYP17 mutation E305G causes isolated 17,20-lyase deficiency by selectively altering substrate binding. *J Biol Chem* 278:48563-48569
7. Youngblood GL, Payne AH 1992 Isolation and characterization of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17): transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells. *Mol Endocrinol* 6:927-934
8. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC 2002 Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352
9. Anderson DC 1974 Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 3:69-96
10. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD 1994 Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100:51-54
11. Matsumine H, Hirato K, Yanaihara T, Tamada T, Yoshida M 1986 Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 63:717-720
12. Miller WR 1991 Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:783-790

13. Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L 1975 The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31:295-319
14. Brodie A, Inkster S 1993 Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:549-555
15. Goji K 1993 Twenty-four-hour concentration profiles of gonadotropin and estradiol (E2) in prepubertal and early pubertal girls: the diurnal rise of E2 is opposite the nocturnal rise of gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1629-1635
16. Flood C, Pratt JH, Longcope C 1976 The metabolic clearance and blood production rates of estriol in normal, non-pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 42:1-8
17. Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT, LeRoith D, Rosenfeld R 1991 Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum Reprod* 6:1213-1219
18. Baird DT, Fraser IS 1974 Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 beta and estrone in women throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 38:1009-1017
19. Paganini-Hill A, Dworsky R, Krauss RM 1996 Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am J Obstet Gynecol* 174:897-902
20. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW, Jr. 1995 Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87:517-523
21. Porter JC 1974 Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol* 63:85-92
22. Soderqvist G, von Schoultz B, Tani E, Skoog L 1993 Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 168:874-879
23. Findlay JK, Britt K, Kerr JB, O'Donnell L, Jones ME, Drummond AE, Simpson ER 2001 The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reprod Fertil Dev* 13:543-547
24. Naftolin F 1994 Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med* 39:257-261
25. Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G, Jr. 1999 Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* 20:97-121

26. Green PS, Bishop J, Simpkins JW 1997 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 17:511-515
27. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S 1998 Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nat Med* 4:447-451
28. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME 1994 Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89:1943-1950
29. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE 1996 Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94:727-733
30. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW 1997 Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 95:1505-1514
31. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW 1995 Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91:755-763
32. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC 1991 Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6613-6617
33. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL 1988 Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241:84-86
34. Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895
35. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20:321-344
36. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H 2000 Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 21:381-388
37. Olefsky JM 2001 Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276:36863-36864
38. Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E, Chambon P 1990 Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 62:1177-1187

39. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P 1989 The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487
40. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P 1987 Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941-951
41. Webster NJG, Green S, Jin JR, Chambon P 1988 The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54:199-207
42. Lees JA, Fawell SE, Parker MG 1989 Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *Nucleic Acids Research* 17:5477-5488
43. Weigel NL, Zhang Y 1998 Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of Molecular Medicine* 76:469-479
44. Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, Chambon P, Gronemeyer H 1989 The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 17:2581-2595
45. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
46. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily 1999 *Cell* 97:161-163
47. Rosenfeld MG, Glass CK 2001 Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J Biol Chem* 276:36865-36868
48. Glass CK, Rosenfeld MG 2000 The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121-141
49. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan X-Y, Sauter G, Kallioniemi O-P, Trent JM, Meltzer PS 1997 AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968
50. Wu C 1997 Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem* 272:28171-28174
51. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG 1997 A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature (London)* 387:733-736

52. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR 1998 Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Development* 12:3343-3356
53. Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL 1998 Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280:1747-1749
54. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV 1998 Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature (London)* 395:137-143
55. Chen JD, Evans RM 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457
56. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, . 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404
57. Moggs JG, Orphanides G 2001 Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2:775-781
58. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M 2000 Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852
59. Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG 1995 Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 14:3741-3751
60. Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Vadlamudi RK, Kumar R 2001 Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis- associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol* 3:30-37
61. Martini PG, Delage-Mourroux R, Kraichely DM, Katzenellenbogen BS 2000 Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol* 20:6224-6232
62. Johansson L, Thomsen JS, Damdimopoulos AE, Spyrou G, Gustafsson J, Treuter E 1999 The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ER α and ER β . *Journal of Biological Chemistry* 274:345-353

63. Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E 2000 DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* 275:39855-39859
64. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornet JM, Argos P, Chambon P 1986 Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature (London)* 320:134-139
65. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-Å 1996 Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5925-5930
66. Mosselman S, Polman J, Dijkema R 1996 ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation of European Biological Societies Letters* 392:49-53
67. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-Å 1997 Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82:4258-4265
68. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V 1997 Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Molecular Endocrinology* 11:353-365
69. Giguère V, Tremblay A, Tremblay GB 1998 Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63:335-339
70. Pettersson K, Gustafsson JA 2001 Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63:165-192
71. Gustafsson JA 1999 Estrogen receptor b. *J Endocrinol* 163:379-383
72. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER- α) and estrogen receptor- β (ER- β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- α -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
73. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863-870
74. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER- α) and

estrogen receptor- β (ER- β) messenger ribonucleic acid In the wild-type and ER- α -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621

75. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA 1998 The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253-286
76. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I 1997 Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525
77. Shang Y, Brown M 2002 Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295:2465-2468
78. Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG 1998 Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *European Molecular Biology Organization Journal* 17:232-243
79. Couse JF, Korach KS 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20:358-417
80. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Lubahn DB, Odonnell TF, Korach KS, Mendelsohn ME 1997 Estrogen Inhibits the Vascular Injury Response In Estrogen Receptor Alpha-Deficient Mice. *Nature Medicine* 3:545-548
81. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS 1999 Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286:2328-2331
82. Hall JM, Couse JF, Korach KS 2001 The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276:36869-36872
83. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M 2000 Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277-4291
84. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguère V 1999 Dominant Activity of Activation Function 1 (AF-1) and Differential Stoichiometric Requirements for AF-1 and -2 in the Estrogen Receptor α - β Heterodimeric Complex. *Molecular and Cellular Biology* 19:1919-1927
85. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-Å, Kushner PJ, Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510

86. Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP 2000 Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 275:35986-35993
87. Smith DF, Toft DO 1993 Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11
88. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG 1992 Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *European Molecular Biology Organization Journal* 11:1025-1033
89. Henttu PM, Kalkhoven E, Parker MG 1997 AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Molecular & Cellular Biology* 17:1832-1839
90. Stoner M, Wormke M, Saville B, Samudio I, Qin C, Abdelrahim M, Safe S 2004 Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene* 23:1052-1063
91. Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfversward C, Skoog L, Somell A, Theve T, Wilking N 1989 Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1:117-120
92. Berry M, Metzger D, Chambon P 1990 Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *European Molecular Biology Organization Journal* 9:2811-2818
93. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie C, Labrie F, Giguère V 1998 EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 139:111-118
94. Pearce ST, Liu H, Jordan VC 2003 Modulation of estrogen receptor alpha function and stability by tamoxifen and a critical amino acid (Asp-538) in helix 12. *J Biol Chem* 278:7630-7638
95. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P 1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494
96. Rowan BG, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW 2000 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical

for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 20:8720-8730

97. Smith CL 1998 Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58:627-632
98. Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW 1993 Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:6120-6124
99. Lamb J, Ladha MH, McMahon C, Sutherland RL, Ewen ME 2000 Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:8667-8675
100. Trowbridge JM, Rogatsky I, Garabedian MJ 1997 Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10132-10137
101. Bunone G, Briand P-A, Miksicek RJ, Picard D 1996 Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *European Molecular Biology Organization Journal* 15:2174-2183
102. Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arao Y, Suzawa M, Kobayashi Y, Yano T, Yoshikawa H, Masuhiro Y, Kato S 2001 A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J* 20:1341-1352
103. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell* 3:513-519
104. Tremblay A, Giguere V 2001 Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:19-27
105. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA 1998 pp90^{rsk1} regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular & Cellular Biology* 18:1978-1984
106. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R 2002 P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J* 21:5437-5447

107. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S 1999 Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular & Cellular Biology* 19:1002-1015
108. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H 2001 Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817-9824
109. Lee H, Bai W 2002 Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22:5835-5845
110. Driggers PH, Segars JH, Rubino DM 2001 The proto-oncoprotein Brx activates estrogen receptor beta by a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:46792-46797
111. Font DM, Brown M 2000 AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:5041-5047
112. Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW 2000 Phosphorylation of Steroid Receptor Coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen- activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275:4475-4483
113. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK 2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541
114. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F 2000 Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19:5406-5417
115. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC 2001 Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719-730
116. Yarden Y, Sliwkowski MX 2001 Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137
117. Zwick E, Bange J, Ullrich A 2001 Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8:161-173
118. van der GP, Hunter T, Lindberg RA 1994 Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337

119. Ullrich A, Schlessinger J 1990 Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212
120. Yarden Y, Ullrich A 1988 Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57:443-478
121. Hunter T 2000 Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100:113-127
122. Schlessinger J 2000 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225
123. Levin ER 2003 Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol Endocrinol* 17:309-317
124. Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ 1997 Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1):61-68
125. Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M 2000 Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 32:1447-1457
126. Kerkhoff E, Houben R, Loffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR 1998 Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene* 16:211-216
127. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A 2001 The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 8:151-159
128. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y 1999 The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4995-5000
129. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, III 1994 Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136
130. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., Leahy DJ 2003 Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421:756-760
131. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE 1997 ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655

132. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y 1996 ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15:254-264
133. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX 1999 Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447:227-231
134. Borg JP, Marchetto S, Le Bivic A, Ollendorff V, Jaulin-Bastard F, Saito H, Fournier E, Adelaide J, Margolis B, Birnbaum D 2000 ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2:407-414
135. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A 1999 EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888
136. Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y 1997 Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 16:4938-4950
137. Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alimandi M, Kuo A, Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y, Alimandi M 1998 ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network [published errata appear in *Mol Cell Biol* 1998 Dec;18(12):7602 and 1999 Dec;19(12):8695]. *Mol Cell Biol* 18:6090-6101
138. Hobbs SS, Coffing SL, Le AT, Cameron EM, Williams EE, Andrew M, Blommel EN, Hammer RP, Chang H, Riese DJ 2002 Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene* 21:8442-8452
139. Barbacci EG, Guarino BC, Stroh JG, Singleton DH, Rosnack KJ, Moyer JD, Andrews GC 1995 The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem* 270:9585-9589
140. Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS 1999 Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* 19:6845-6857
141. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y 1998 c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12:3663-3674

142. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G 1996 All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271:5251-5257
143. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, Van de Poll ML, Van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, Van Zoelen EJ, Yarden Y 1998 Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17:3385-3397
144. Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE 1998 ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18:5042-5051
145. Schaeffer L, Duclert N, Huchet-Dymanus M, Changeux JP 1998 Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* 17:3078-3090
146. Fedi P, Pierce JH, Di Fiore PP, Kraus MH 1994 Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 14:492-500
147. Prigent SA, Gullick WJ 1994 Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J* 13:2831-2841
148. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, III, Hynes NE 2003 The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8933-8938
149. Riese DJ, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF 1995 The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15:5770-5776
150. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y 1996 Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15:2452-2467
151. Kokai Y, Myers JN, Wada T, Brown VI, LeVea CM, Davis JG, Dobashi K, Greene MI 1989 Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58:287-292
152. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE 1999 ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274:17209-17218

153. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH 1995 Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10:1813-1821
154. Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A 1995 Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 14:4267-4275
155. Chausovsky A, Waterman H, Elbaum M, Yarden Y, Geiger B, Bershadsky AD 2000 Molecular requirements for the effect of neuregulin on cell spreading, motility and colony organization. *Oncogene* 19:878-888
156. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourtton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ, Magnuson T 1995 Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269:230-234
157. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R 1995 Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341
158. Sibilio M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF 1998 A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 17:719-731
159. Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR 1993 Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73:249-261
160. Luetke NC, Qiu TH, Peiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC 1993 TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73:263-278
161. Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T 2000 Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127:2617-2627
162. Burden S, Yarden Y 1997 Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18:847-855
163. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G 1995 Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394

164. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C 1995 Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378:394-398
165. Meyer D, Birchmeier C 1995 Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390
166. Liu X, Hwang H, Cao L, Buckland M, Cunningham A, Chen J, Chien KR, Graham RM, Zhou M 1998 Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13024-13029
167. Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE 1996 Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4833-4838
168. Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D 1998 The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12:1825-1836
169. Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW 1997 ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* 124:4999-5011
170. Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C 1997 Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730
171. Fischbach GD, Rosen KM 1997 ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci* 20:429-458
172. Hennighausen L, Robinson GW 1998 Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes & Development* 12:449-455
173. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE 2000 The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167
174. Fowler KJ, Walker F, Alexander W, Hibbs ML, Nice EC, Bohmer RM, Mann GB, Thumwood C, Maglito R, Danks JA, . 1995 A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1465-1469
175. Xie W, Paterson AJ, Chin E, Nabell LM, Kudlow JE 1997 Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the

mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development. *Mol Endocrinol* 11:1766-1781

176. Jones FE, Stern DF 1999 Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 18:3481-3490
177. Jones FE, Welte T, Fu XY, Stern DF 1999 ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol* 147:77-88
178. Watanabe M, Nobuta A, Tanaka J, Asaka M 1996 An effect of K-ras gene mutation on epidermal growth factor receptor signal transduction in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* 67:264-268
179. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Bigner DD 1998 The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 4:148-158
180. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B 1992 Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2965-2969
181. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ 1995 Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55:5536-5539
182. Pedersen MW, Thykjaer T, Orntoft TF, Damstrup L, Poulsen HS 2001 Profile of differentially expressed genes mediated by the type III epidermal growth factor receptor mutation expressed in a small-cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 85:1211-1218
183. Menzo S, Clementi M, Alfani E, Bagnarelli P, Iacovacci S, Manzin A, Dandri M, Natoli G, Levrero M, Carloni G 1993 Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. *Virology* 196:878-882
184. Adelsman MA, Huntley BK, Maihle NJ 1996 Ligand-independent dimerization of oncogenic v-erbB products involves covalent interactions. *J Virol* 70:2533-2544
185. Ross JS, Fletcher JA 1998 The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3:237-252

186. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, . 1989 Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712
187. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL 1987 Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182
188. Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE 1995 Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 15:6496-6505
189. Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL 2000 ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148:385-397
190. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA 1986 Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45:649-657
191. Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI 1989 A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339:230-231
192. Holbro T, Civenni G, Hynes NE 2003 The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284:99-110
193. Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE 2000 ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20:3210-3223
194. Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE 2000 Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 19:1647-1656
195. Hynes NE, Lane HA 2001 Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:141-150
196. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL 2002 PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8:1145-1152
197. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsichlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M 2002

Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8:1136-1144

198. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM 2002 PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8:1153-1160
199. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S, Sigurdsson H 1994 ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett* 81:137-144
200. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S 1996 c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14:2702-2708
201. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ 1995 HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10:2435-2446
202. Antoniotti S, Taverna D, Maggiora P, Sapei ML, Hynes NE, De Bortoli M 1994 Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 70:1095-1101
203. Russell KS, Hung MC 1992 Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Res* 52:6624-6629
204. Giani C, Casalini P, Pupa SM, De Vecchi R, Ardini E, Colnaghi MI, Giordano A, Menard S 1998 Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation. *Oncogene* 17:425-432
205. Grasso AW, Wen D, Miller CM, Rhim JS, Pretlow TG, Kung HJ 1997 ErbB kinases and NDF signaling in human prostate cancer cells. *Oncogene* 15:2705-2716
206. Kew TY, Bell JA, Pinder SE, Denley H, Srinivasan R, Gullick WJ, Nicholson RI, Blamey RW, Ellis IO 2000 c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 82:1163-1170
207. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ 1999 Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of

mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *European Molecular Biology Organization Journal* 18:2149-2164

208. Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E, Prigent SA, Gullick WJ, Hurst HC 1992 Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 66:1116-1121
209. Rajkumar T, Stamp GW, Pandha HS, Waxman J, Gullick WJ 1996 Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer. *J Pathol* 179:381-385
210. Bodey B, Bodey B, Jr., Groger AM, Luck JV, Siegel SE, Taylor CR, Kaiser HE 1997 Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res* 17:1319-1330
211. Lyne JC, Melhem MF, Finley GG, Wen D, Liu N, Deng DH, Salup R 1997 Tissue expression of neu differentiation factor/herregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *Cancer J Sci Am* 3:21-30
212. Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N 2002 Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res* 62:3132-3137
213. Hellyer NJ, Kim MS, Koland JG 2001 Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor. *J Biol Chem* 276:42153-42161
214. Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE 2000 ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20:3210-3223
215. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA 2002 The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62:3151-3158
216. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N 2002 Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21:1159-1166
217. Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, Nishida M, Tamura R, Yamamori K, Nakamura T, Nozaki S, Kameda-Takemura K, Kawata S, Taniguchi N, Higashiyama S, Matsuzawa Y 1996 Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries.

Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis.
Circulation 94:2778-2786

218. Ben Bassat H, Klein BY 2000 Inhibitors of tyrosine kinases in the treatment of psoriasis. *Curr Pharm Des* 6:933-942
219. Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J 1994 Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 269:27595-27602
220. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J 1995 Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1:1311-1318
221. Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A, Mendelsohn J 1996 Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12:1397-1403
222. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA 1999 Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26:60-70
223. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV 2000 Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446
224. Disis ML, Cheever MA 1997 HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv Cancer Res* 71:343-371
225. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS 2003 Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10:1-21
226. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS 2003 Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10:1-21
227. Xu W, Mimnaugh E, Rosser MF, Nicchitta C, Marcu M, Yarden Y, Neckers L 2001 Sensitivity of mature Erbb2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J Biol Chem* 276:3702-3708
228. Chang JY, Xia W, Shao R, Sorgi F, Hortobagyi GN, Huang L, Hung MC 1997 The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 14:561-568
229. Brown NL, Lemoine NR 2004 Clinical Trials With GDEPT: Cytosine Deaminase and 5-Fluorocytosine. *Methods Mol Med* 90:451-458

230. Vaughn JP, Iglehart JD, Demirdji S, Davis P, Babiss LE, Caruthers MH, Marks JR 1995 Antisense DNA downregulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8338-8342
231. Hsieh SS, Malerczyk C, Aigner A, Czubyko F 2000 ERbB-2 expression is rate-limiting for epidermal growth factor-mediated stimulation of ovarian cancer cell proliferation. *Int J Cancer* 86:644-651
232. Qian X, Dougall WC, Hellman ME, Greene MI 1994 Kinase-deficient neu proteins suppress epidermal growth factor receptor function and abolish cell transformation. *Oncogene* 9:1507-1514
233. Levi AD, Bunge RP, Lofgren JA, Meima L, Hefti F, Nikolics K, Sliwkowski MX 1995 The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J Neurosci* 15:1329-1340
234. Levi AD, Sonntag VK, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordoba SC, Bichard B, Berens M 1997 The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp Neurol* 143:25-36
235. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang S-M, Subramanian S, McInerney EM, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ 1998 Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Molecular Endocrinology* 12:1605-1618
236. Tang CK, Perez C, Grunt T, Waibel C, Cho C, Lupu R 1996 Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone- independent phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 56:3350-3358
237. Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G, Harant H, Huber H, Dittrich C 1995 Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 63:560-567
238. Kumar R, Wang RA, Mazumdar A, Talukder AH, Mandal M, Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Sahin A, Hortobagyi G, Adam L, Barnes CJ, Vadlamudi RK 2002 A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418:654-657
239. Marikovsky M, Lavi S, Pinkas-Kramarski R, Karunagaran D, Liu N, Wen D, Yarden Y 1995 ErbB-3 mediates differential mitogenic effects of NDF/hergulin isoforms on mouse keratinocytes. *Oncogene* 10:1403-1411
240. Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G, Harant H, Huber H, Dittrich C 1995 Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 63:560-567

241. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG 1997 Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry* 272:19858-19862
242. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GGJM, Gustafsson J-Å 1997 Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology* 11:1486-1496
243. McKenna NJ, O'Malley BW 2002 Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. *Endocrinology* 143:2461-2465
244. Giguère V, Tremblay A, Tremblay GB 1998 Estrogen receptor β : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63:335-339
245. Ali S, Coombes RC 2002 Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2:101-112
246. Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA 1993 Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Molecular Endocrinology* 7:992-998
247. Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, Yee D 1999 Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13:787-796
248. Lupu R, Cardillo M, Cho C, Harris L, Hijazi M, Perez C, Rosenberg K, Yang D, Tang C 1996 The significance of heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. *Breast Cancer Research & Treatment* 38:57-66
249. Atlas E, Cardillo M, Mehmi I, Zahedkargaran H, Tang C, Lupu R 2003 Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* 1:165-175
250. Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, Lambert-Falls R, Havlin K, Overmoyer B, Friedlander RJ, Jr., Gargiulo J, Strenger R, Vogel CL, Ryan PD, Ellis MJ, Nunes RA, Bunnell CA, Campos SM, Hallor M, Gelman R, Winer EP 2003 Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 21:2889-2895
251. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A 2002 Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1:117-123

252. Yu D, Hung MC 2000 Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19:6115-6121
253. Brunner N, Boysen B, Jirus S, Skaar TC, Holsthansen C, Lippman J, Frandsen T, Spangthomsen M, Fuqua SAW, Clarke R 1997 MCF-7/LCC9 - an Antiestrogen-Resistant MCF-7 Variant In Which Acquired Resistance to the Steroidal Antiestrogen ICI 182,780 Confers an Early Cross-Resistance to the Nonsteroidal Antiestrogen Tamoxifen. *Cancer Research* 57:3486-3493
254. Howell A, DeFriend DJ, Robertson J, Blamey R, Walton P 1995 Response to a specific antiestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* 345:29-30
255. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harvey H, Demers L, Lipton A 1995 Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 13:1129-1135
256. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK 1993 Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24:85-95
257. Liu Y, El Ashry D, Chen D, Ding IY, Kern FG 1995 MCF-7 breast cancer cells overexpressing transfected c-erbB-2 have an in vitro growth advantage in estrogen-depleted conditions and reduced estrogen-dependence and tamoxifen-sensitivity in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 34:97-117
258. Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL 2000 Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 60:5887-5894
259. Coutts AS, Murphy LC 1998 Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen- nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* 58:4071-4074
260. Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JM, Harper ME, Barrow D, Wakeling AE, Nicholson RI 2003 Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 144:1032-1044
261. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA 2002 Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9:1-13

262. Neve RM, Holbro T, Hynes NE 2002 Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 21:4567-4576
263. Sweeney C, Carraway KL, III 2000 Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 19:5568-5573
264. Fiddes RJ, Janes PW, Sivertsen SP, Sutherland RL, Musgrove EA, Daly RJ 1998 Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cells. *Oncogene* 16:2803-2813
265. Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamonti AJ, Lander ES, Cantley LC, Carraway KL, III 2001 Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem* 276:22685-22698
266. Badia E, Duchesne MJ, Fournier-Bidoz S, Simar-Blanchet AE, Terouanne B, Nicolas JC, Pons M 1994 Hydroxytamoxifen induces a rapid and irreversible inactivation of an estrogenic response in an MCF-7-derived cell line. *Cancer Res* 54:5860-5866
267. Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI 1989 A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339:230-231
268. Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ 1998 Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273:1741-1748
269. Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M 1998 Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Molecular & Cellular Biology* 18:442-449
270. Dowsett M, Harper-Wynne C, Boeddinghaus I, Salter J, Hills M, Dixon M, Ebbs S, Gui G, Sacks N, Smith I 2001 HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 61:8452-8458
271. Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI 1989 A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339:230-231
272. Hall JM, McDonnell DP 1999 The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-5578

273. Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S 1999 Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19:5363-5372
274. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3:521-526
275. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK 1997 Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen- activated protein kinase site. *Journal of Biological Chemistry* 272:5128-5132
276. Camp HS, Tafuri SR 1997 Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272:10811-10816
277. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA 1998 Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature (London)* 396:377-380
278. Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C 2001 Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7200-7205
279. Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P, Rochette-Egly C 2000 TFIID interacts with the Retinoic Acid Receptor gamma (RAR{gamma}) and phosphorylates its AF-1 Activating domain through cdk7. *J Biol Chem*
280. Lee HY, Suh Y, Robinson MJ, Clifford JL, Hong WK, Woodgett JR, Cobb MH, Mangelsdorf DJ, Kurie JM 2000 Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J Biol Chem*
281. Shen T, Horwitz KB, Lange CA 2001 Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21:6122-6131
282. Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwaijri S, Chang C 2002 Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 21:4037-4048
283. Oñate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW 1998 The steroid receptor coactivator-1 contains multiple

receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273:12101-12108

284. Dutertre M, Smith CL 2003 Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol* 17:1296-1314
285. Goodman RH, Smolik S 2000 CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14:1553-1577
286. Font de Mora J, Brown M 2000 AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:5041-5047
287. Hong S-H, Wong C-H, Privalsky ML 1998 Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor) corepressor. *Molecular Endocrinology* 12:1161-1171
288. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW 1998 Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2920-2925
289. Hong SH, Privalsky ML 2000 The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol* 20:6612-6625
290. Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC 2000 HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 275:8027-8031
291. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC 2001 Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802-808
292. Harari D, Yarden Y 2000 Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19:6102-6114
293. Wen D, Suggs SV, Karunagaran D, Liu N, Cupples RL, Luo Y, Janssen AM, Ben Baruch N, Trollinger DB, Jacobsen VL 1994 Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* 14:1909-1919

294. Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE 1997 Neu differentiation factor induces ErbB2 down-regulation and apoptosis of ErbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res* 57:3804-3811
295. Marquez DC, Lee J, Lin T, Pietras RJ 2001 Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 16:73-81
296. Marquez DC, Lee J, Lin T, Pietras RJ 2001 Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 16:73-81
297. Treeck O, Weber A, Boester M, Porz S, Frey N, Diedrich K, Ortmann O 2003 H-ras dependent estrogenic effects of epidermal growth factor in the estrogen-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Breast Cancer Res Treat* 80:155-162
298. Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty MK 1998 Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 78:1385-1390
299. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS 2001 Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 7:1957-1962
300. Kim HH, Vijapurkar U, Hellyer NJ, Bravo D, Koland JG 1998 Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J* 334 (Pt 1):189-195
301. Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G, Harant H, Huber H, Dittrich C 1995 Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 63:560-567

